



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina

Escuela Profesional de Tecnología Médica

Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus* sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* - Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” UNMSM

TESIS

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología
Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

AUTOR

Jorge Andres SANCHEZ PEREZ

ASESORES

Vilma Ruth BÉJAR CASTILLO (Asesor)

Freddy VILLANUEVA COTRINA (Co-asesor)

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Sánchez J. Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus* sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* - Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” UNMSM [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica; 2019.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina
Escuela Profesional de Tecnología Médica



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

#244
Sacar copia
acta

Conforme a lo estipulado en el Art. 113 inciso C del Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (R.R. No. 03013-R-16) y Art. 45.2 de la Ley Universitaria 30220. El Jurado de Sustentación de Tesis nombrado por la Dirección de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, conformado por los siguientes docentes:

Presidente: Lic. Elizabeth Irene Pareja Cuadros
Miembros: Lic. Carlos Raúl Sevilla Andrade
Dr. José María Guevara Granados
Asesor : Dra. Vilma Ruth Béjar Castillo

Se reunieron en la ciudad de Lima, el día 19 de febrero 2019, procediendo a evaluar la Sustentación de Tesis, titulado **“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Aspergillus fumigatus* SOBRE CEPAS CLÍNICAS DE *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* – INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “DANIEL ALCIDES CARRIÓN” UNMSM**”, para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica del egresado:

JORGE ANDRES SANCHEZ PEREZ

Habiendo obtenido el calificativo de:

.....19.....
(en números)

.....Diecinueve.....
(en letras)

Que corresponde a la mención de: **SOBRESALIENTE**

Quedando conforme con lo antes expuesto, se disponen a firmar la presente Acta.

.....
Presidente
Lic. Elizabeth Irene Pareja Cuadros

.....
Miembro
Lic. Carlos Raúl Sevilla Andrade

.....
Miembro
Dr. José María Guevara Granados



.....
Asesor(a) de Tesis
Dra. Vilma Ruth Béjar Castillo

**Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de
Aspergillus fumigatus sobre cepas clínicas de *Staphylococcus
aureus* y *Streptococcus pneumoniae* - Instituto de Medicina
Tropical “Daniel Alcides Carrión” UNMSM.**

Autor: SANCHEZ PEREZ, JORGE ANDRES

Asesor: Doctora BÉJAR CASTILLO, VILMA RUTH

Co-asesor: Licenciado VILLANUEVA COTRINA, FREDDY

DEDICATORIA

A mis padres Gloria Pérez y Jorge Sánchez, y a mi hermano Juan Carlos.

A mis tías, tíos y primos. Mis abuelos en el cielo.

Al esfuerzo en conjunto de todos aquellos quienes participan en la lucha contra la resistencia antimicrobiana.

AGRADECIMIENTOS

A mamá y papá, por la confianza y apoyo incondicional en las decisiones que he tomado hasta el momento y darme mucho amor y estima. Por sus sacrificios y sueños que han cumplido y cumplirán.

A mi hermano, por siempre ayudarme cuando lo necesito y ser un gran amigo. Por respetar mis espacios y compartir buenos momentos.

A mi asesora y co-asesor que me dieron las herramientas para seguir una línea de investigación y su aprecio para que pueda formar parte de sus proyectos. Gracias por la confianza depositada.

A mis profesores Ricardo Rodríguez y Segundo León. Por ser ejemplos en la motivación asociada a la docencia e investigación.

Al laboratorio de Carbohidratos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica a cargo del Dr. Fuertes Ruitón, por el apoyo en la caracterización química cualitativa del extracto orgánico.

Al servicio de Microbiología del INSN. A todos los licenciados por sus recomendaciones, sugerencias y apoyo en la elaboración del proyecto.

A mis amigos de la universidad en general.

ÍNDICE

CAPÍTULO I

1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES.....	12
1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	13
1.3 OBJETIVOS	
1.3.1 Objetivo general.....	14
1.3.2 Objetivos específicos.....	15
1.4 BASES TEÓRICAS	
1.4.1 BASE TEÓRICA.....	15
1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS.....	25
1.4.3 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS.....	25

CAPÍTULO II

2.1. DISEÑO METODOLÓGICO.	
2.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	28
2.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	28
2.1.3 MUESTRA y MUESTREO.....	28
2.1.4 VARIABLES.....	28
2.2. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	
2.2.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE <i>Aspergillus fumigatus</i> ...28	
2.2.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA CUALITATIVA DEL EXTRACTO CRUDO.....	32
2.2.3. EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA.....	33
2.2.4. LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	36
2.3. PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS.....	37
2.4. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	37

CAPÍTULO III:

RESULTADOS

3.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE AF.....	40
3.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA CUALITATIVA.....	41
3.3. EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA.....	42

CAPÍTULO IV:

DISCUSIÓN.....	51
----------------	----

CAPÍTULO V:

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES.....	59
5.2. RECOMENDACIONES.....	60

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
---------------------------------	----

ANEXOS.....	68
-------------	----

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los grupos funcionales de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus*.

Tabla 2. Metodología de evaluación de actividad antimicrobiana de *Aspergillus fumigatus* sobre el crecimiento *in vitro* de cepas bacterianas.

Tabla 3. *Staphylococcus aureus*: Resistencia a meticilina (MRSA) Región de las Américas.

Tabla 4. *Streptococcus pneumoniae*: Resistencia, o no susceptibilidad, a penicilina. Región de las Américas.

Tabla 5. Características del cultivo del aislamiento clínico de *Aspergillus fumigatus* (AF303).

Tabla 6: Características físicas de las fases orgánicas obtenidas de la fermentación de AF303.

Tabla 7: Resultados de la caracterización cualitativa química del extracto crudo de AF303.

Tabla 8: Actividad antimicrobiana del extracto crudo de AF303 sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 9: Actividad antimicrobiana del extracto crudo de AF303 sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 10: Promedio de los diámetros de inhibición producidos por el extracto crudo de AF303 sobre cepas clínicas de *Streptococcus pneumoniae*.

Tabla 11: Actividad antimicrobiana del extracto crudo de AF303 sobre cepas clínicas de *Streptococcus pneumoniae*.

LISTA DE GRÁFICOS

Figura 1. Curva de cinética de crecimiento de *Aspergillus sp.*

Figura 2. Metabolitos secundarios aislados de *Aspergillus fumigatus* R7.

Figura 3. Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento clínico de *Aspergillus fumigatus* 303.

Figura 4. Recuento de conidias en cámara de Neubauer.

Figura 5. Plantilla para la evaluación antimicrobiana en agar Müller-Hinton.

Figura 6. Biomasa de la fermentación líquida de AF303.

Figura 7. Resultados de las reacciones de caracterización cualitativa química del extracto crudo de AF303.

Figura 8. Intervalos de los diámetros de inhibición antimicrobiana por difusión en pozo sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.

Figura 9. Intervalos de los diámetros de inhibición antimicrobiana por difusión en disco sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.

Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus* sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*

Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” UNMSM

Resumen

Introducción: Los metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus* han sido ampliamente estudiados desde su composición química y actividad biológica como, por ejemplo, su actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas y levaduras.

Objetivo: Evaluar la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus* sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.

Material y métodos: La fermentación líquida de un aislamiento clínico de *Aspergillus fumigatus* fue realizada en un caldo líquido Sulfato, Papa y Dextrosa (SPG). La extracción de metabolitos del caldo de cultivo fermentado fue realizada usando acetato de etilo. Se evaluó la actividad antimicrobiana sobre cepas clínicas de cocos Gram positivos mediante los métodos de disco y pozo difusión. **Resultados:** Se obtuvo una media de 24 y 23 mm sobre *Staphylococcus aureus* sensible y resistente respectivamente por disco difusión. Para las cepas sensibles y resistentes de *Streptococcus pneumoniae* las medias fueron de 26 mm según disco difusión. Existe diferencia significativa entre la metodología de difusión de disco y pozo ($p < 0.05$) **Conclusión:** El extracto crudo de *Aspergillus fumigatus* posee metabolitos secundarios de naturaleza alcaloide, esteroides insaturados y terpenos; con efectiva actividad antimicrobiana sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* sensibles y resistentes.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, *Aspergillus fumigatus*, metabolitos secundarios, fermentación líquida, cepas clínicas. (Fuente: DeCS Bireme)

Antimicrobial activity of secondary metabolites of *Aspergillus fumigatus* on clinical strains of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*

Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” UNMSM

Abstract

Introduction: Secondary metabolites of *Aspergillus fumigatus* have been widely analyzed from their chemical composition and biological activity as, for example, their antimicrobial activity on Gram positive bacteria and yeasts. **Objective:** To evaluate the antimicrobial activity of secondary metabolites of *Aspergillus fumigatus* on clinical strains of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. **Material and methods:** The liquid fermentation of a clinical isolate of *Aspergillus fumigatus* was carried out in a liquid broth Sulfate, Potato and Dextrose (SPG). The extraction of metabolites from the fermented culture broth was carried out using ethyl acetate. The antimicrobial activity was evaluated on clinical strains of Gram-positive cocci by disc and well diffusion methods. **Results:** A mean of 24 and 23 mm was obtained on sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* respectively by disc diffusion. For the sensitive and resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* the means were 26 mm according to diffusion disc. There is a significant difference between the disc and well diffusion methodology ($p < 0.05$). **Conclusion:** The crude extract of *Aspergillus fumigatus* has secondary metabolites of alkaloid nature, unsaturated sterols and terpenes; with effective antimicrobial activity on sensitive and resistant clinical strains of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*.

Key words: Antimicrobial activity, *Aspergillus fumigatus*, clinical strains, secondary metabolites, liquid fermentation. (Fuente: MeSH NLM)

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES

La obtención, aislamiento y purificación de compuestos con actividad antimicrobiana a partir de la fermentación de hongos filamentosos es una metodología que ha sido ampliamente utilizada bajo diversas condiciones. Los hongos producen determinados metabolitos durante su interacción y desarrollo en distintas condiciones ambientales como temperatura, nutrientes, pH o tiempo de fermentación. ⁽¹⁾ Es así como elaboran diversos compuestos de variada naturaleza química como alcaloides, sesquiterpenlactonas, esteroides insaturados y politerpenos ^(2, 3); los cuales poseen diversa actividad biológica: antimicrobiana, citotóxica, antioxidante y antitumoral ⁽⁴⁻⁷⁾.

Para el género *Aspergillus* se han reconocido alrededor de 226 metabolitos secundarios, los cuales poseen un amplio alcance de actividad antimicrobiana como citotóxica. ⁽¹¹⁾ Se ha evaluado la actividad biológica de extractos orgánicos de hongos marinos, endofíticos, de suelos, entre otros, sobre bacterias Gram negativas, Gram positivas y hongos patógenos. ^(1, 3-5, 8) Ante la necesidad de encontrar nuevas drogas las cuales frenen el avance continuo de la propagación de cepas con susceptibilidad disminuida o resistencia a antimicrobianos, ligadas a las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) o adquiridas en la comunidad; se encuentra la capacidad antibacteriana de los metabolitos secundarios a partir de un aislamiento clínico de *Aspergillus fumigatus* cuyos principios activos podrían ser una alternativa con nuevos mecanismos de acción farmacológicos. ^(6, 7) La evaluación antibacteriana *in vitro*, siguiendo la metodología de difusión en agar junto a las recomendaciones del desempeño de las pruebas de susceptibilidad del *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI), evidencia halos de inhibición del crecimiento bacteriano al enfrentar con bacterias un extracto crudo obtenido con solventes orgánicos de mediana a baja polaridad. ⁽¹²⁾ Los estudios preliminares que evalúan actividad antimicrobiana de un microorganismo comienzan con demostrar el efecto de inhibición del crecimiento de bacterias u hongos en condiciones controladas. Posteriormente, se caracterizan cualitativa y cuantitativamente los compuestos orgánicos mediante fracciones que demuestren un rendimiento efectivo sobre un determinado microorganismo. De esta forma se podrían sintetizar nuevas moléculas con valor terapéutico innovador y de menores costos de producción.

Del grupo de bacterias Gram positivas, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) son dos de los microorganismos de mayor importancia clínica debido a sus altas tasas de morbilidad tanto como factor etiológico de

enfermedades asociadas a partes blandas y sistema respiratorio, así como su diseminación en la comunidad por portadores asintomáticos. ⁽¹⁷⁾ Como causa de lo anteriormente expuesto derivan las principales causas de mortalidad debido a: infecciones invasivas sobre pacientes inmunodeprimidos, infecciones nosocomiales de las cuales el 15-60% están asociadas a shock por sepsis ⁽¹⁵⁾, y propagación de genes asociados a la resistencia a antibióticos. ⁽¹⁶⁾ *S. aureus* solía ser sensible a antibióticos de bajo espectro como la penicilina; pasando a adquirir resistencia a betalactámicos semisintéticos como la oxacilina, la cual es estable ante la acción de enzimas de tipo penicilinasas. ⁽¹⁸⁾ En los últimos años se ha detectado una mayor incidencia en el aislamiento de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA), tanto de infecciones adquiridas en la comunidad ⁽¹⁹⁾, como de infecciones nosocomiales. El último reporte del INS con respecto a las IAAS indica que el 84% de infecciones asociadas a *S. aureus* no son susceptibles a betalactámicos ⁽²⁰⁾, siendo más grave la emergencia de resistencia a otras familias de antibióticos. Por otro lado, *S. pneumoniae* es reconocido como comensal de vías respiratorias en portadores asintomáticos; o como agente etiológico de neumonía y meningitis neumocócica, o por su alta capacidad invasiva. De las cepas aisladas tanto de portadores sanos como enfermos, el fenotipo dominante presenta resistencia a penicilina. Aunque penicilina no se utilice en la terapéutica clínica para este tipo de agente etiológico, funciona como un tamizaje de resistencia a otros antibióticos. ⁽²¹⁾

Por lo anteriormente expuesto, es importante demostrar la capacidad antimicrobiana del extracto crudo de *Aspergillus fumigatus*, aislado de pacientes con micosis invasiva producto de un aspergiloma pulmonar, sobre cocos Gram positivos causantes de infecciones de alto impacto epidemiológico como una alternativa para descubrir y producir mejores y más accesibles compuestos antibióticos que sean eficientes ante la resistencia de estas bacterias.

1.2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

La disminución drástica en la producción industrial de nuevos medicamentos antimicrobianos debido a la falta de interés en el descubrimiento de nuevos principios activos con actividad biológica trae consigo un problema de salud pública para el tratamiento clínico de microorganismos resistentes. ^(22, 23) Es por ello que continuamente se abren nuevas líneas de investigación biomédica para la producción (semi) sintética de novedosos principios activos con actividad biológica.

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural desarrollado por las bacterias, siendo esta acelerada por procesos de selección y propagación debido al consumo inapropiado y diseminación de estos fármacos en la industria. Esto se traduce socialmente en un elevado costo en la salud pública al ser mayores los tiempos de tratamiento, mayor tiempo de hospitalización, mayor presupuesto en atención médica y aumento de la mortalidad ante el fracaso de tratamientos convencionales. ^(20, 23)

Estudios anteriores han evaluado la actividad de inhibición sobre el crecimiento bacteriano por los metabolitos secundarios producidos a partir aislamientos ambientales de *Aspergillus* sp. sobre el crecimiento *in vitro* de cepas bacterianas de referencia (ATCC) del grupo de las Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus cereus*), Gram negativas (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa*) y levaduras (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*). ⁽⁴⁾

Así mismo, la literatura nos refiere el análisis químico cualitativo y cuantitativo de la composición de los extractos orgánicos extraídos e identificados mediante técnicas sofisticadas de cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS) ⁽⁴⁷⁾ y cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) ^(10, 28).

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana y caracterizar cualitativamente los metabolitos secundarios extraídos de aislamientos de *Aspergillus fumigatus* recuperados de cuadros de micosis invasiva. Siendo uno de los primeros estudios preliminares en la región el cual emplea este tipo de muestra biológica donde los principios activos son evaluados sobre el crecimiento *in vitro* de bacterias aisladas de especímenes clínicos, cuyos fenotipos y susceptibilidad antimicrobiana fueron previamente caracterizadas para ser incluidas en este trabajo bajo el término de cepas clínicas.

La necesidad del estudio y producción de nuevos compuestos antimicrobianos ante la escasa y poca premura en la producción de los mismos en los últimos años es un tema gravitante. Este es un estudio preliminar donde se evalúa la actividad antimicrobiana de un extracto orgánico de *Aspergillus fumigatus* sobre bacterias Gram positivas de importancia epidemiológica. Estudios posteriores siguiendo esta línea de investigación podrán demostrar efecto de inhibición sobre otros gérmenes con impacto en salud pública debido a sus perfiles de multidrogo resistencia.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus* sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.

1.3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar cualitativamente la composición química del extracto orgánico de *Aspergillus fumigatus*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto orgánico sobre aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* meticilino sensible y meticilino resistente.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto orgánico sobre aislamientos clínicos de *Streptococcus pneumoniae* penicilino sensible y penicilino resistente.
- Comparar los halos de inhibición del crecimiento bacteriano entre la difusión en pozo y disco, ambos de 6 mm de diámetro.

1.4. BASES TEÓRICAS

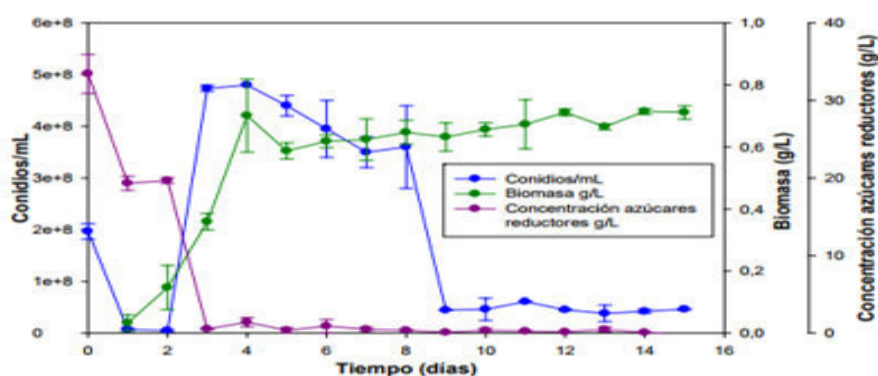
1.4.1. Base Teórica

El hongo *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) pertenece al grupo de los ascomicetos los cuales son hongos filamentosos hialinos de distribución ubicua en el medio ambiente. Debido a su naturaleza saprofita suelen encontrarse en medios naturales: suelos, ambientes marinos, detritus y materia orgánica; así como los hongos endofíticos donde se establece una relación de mutualismo/patogénesis con diversos tipos de plantas caracterizada por una relación equilibrada entre enzimas y metabolitos secundarios, inducción de expresión de mecanismos de defensa de la planta hospedera, y por ocupación del nicho ecológico por parte del hongo.⁽²⁴⁻²⁶⁾ Se distribuye en una amplia variedad de nichos ecológicos abióticos y bióticos dependiendo en gran medida de la temperatura, pH (2-9, óptimo entre 5-6) y aerobiosis (proporción suficiente de oxigenación en relación 1/5 *in vitro*); así como la disponibilidad de nutrientes ricos en carbohidratos simples (altas concentraciones 10%) y metales trazas (nitrógeno, azufre, amonio); nutrientes que son hidrolizados por enzimas extracelulares secretadas por los extremos de las hifas.^(27, 28)

La cinética del metabolismo de *Aspergillus* se puede dividir en dos fases: trofofase e idiofase. La primera fundamental para el desarrollo y proliferación en cualquier medio

nutritivo y además abastece de precursores y cofactores para la síntesis de metabolitos secundarios en la siguiente fase. Esta fase de la cinética de crecimiento de *A. fumigatus* suele durar 4 días principalmente en fase líquida donde se expresan los metabolitos extracelulares o intracelulares ⁽²⁹⁾. Y la idiofase, o fase estacionaria, donde la depleción de la concentración de carbohidratos y conidias conduce a una mayor producción de metabolitos secundarios los cuales no son indispensables para el correcto funcionamiento de las vías metabólicas esenciales del crecimiento, contrario a los metabolitos primarios, sino surgen como respuesta de adaptación, reproducción y competencia. ⁽³¹⁾

Figura 1: Cinética de crecimiento de *Aspergillus sp.*



Fuente: Hernández P. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios detectados por fermentación en medio líquido de *Aspergillus sp.* nativo del páramo de Cruz Verde (2012)

Durante las infecciones en seres humanos el hongo posee un comportamiento fisiológico particular ante un nicho ecológico distinto al medio ambiente, donde su capacidad de formar hifas aéreas y posteriormente conidias asexuales con amplio rango de adaptación a condiciones fisiológicas en homeostasis es variable. ^(24, 32) La inhalación de estas conidias por los seres humanos es ampliamente reconocida como factor etiológico de alrededor del 90% de micosis, presentando manifestaciones clínicas como alergias, reacciones asmáticas o un cuadro más severos como la aspergilosis broncopulmonar alérgica, aspergiloma y colonización extrapulmonar, y septicemia especialmente en personas con compromiso del sistema inmune. ⁽³⁴⁻³⁷⁾ El aspergiloma pulmonar consiste en una masa sólida compuesta de hifas, fibrina, moco y residuos celulares la cual generalmente crece en una cavidad preexistente como aquellas formadas en pacientes con antecedentes clínicos de tuberculosis pulmonar. ⁽³³⁾ Como principales mecanismos ecofisiológicos de la patogenia de las especies de *Aspergillus* se menciona la producción de biopelículas *in vivo* como resistencia a la terapia antifúngica, producción exacerbada

de mucosidad favorecida por la coexistencia mixta entre *Aspergillus* con bacterias de las vías aéreas ^(24, 34, 35), progresiva extensión hifal intracelular del endotelio con niveles elevados de galactomanano durante la fase invasiva ⁽³²⁾, producción de enzimas antagonistas del estrés oxidativo, toxinas (gliotoxinas), como los más importantes. ⁽³⁶⁾

La caracterización molecular de una cepa de *A. fumigatus*, Af293, aislada a partir de un espécimen clínico de micosis invasiva fue completada según el secuenciamiento genómico de 29.4 megabases. Se encuentra compuesta por ocho cromosomas los cuales contienen 9 926 genes. Estos genes se encuentran comprendidos en 26 acúmulos (*clusters*), la mayoría de ellos específicos según la especie: poliketido sintasa, péptido no-ribosomal sintasa y/o dimetilalil triptófano sintasa. La expresión de estos genes está estrechamente relacionada con la virulencia incrementada por sus numerosos metabolitos secundarios: fumagilina, fumitremorgina, verruculogeno, fumigaclavina, ácido helvólico y esfingofunginas. ⁽³⁷⁾

Así como todo organismo responde orgánicamente a estímulos externos, está ampliamente estudiada la expresión de diversos fenotipos de respuesta virulenta y antigénica que expresa *A. fumigatus*, los cuales podrían extrapolarse a las características del medio interno humano. Entre los principales mecanismos de adaptación que expresa este hongo se pueden mencionar: termotolerancia (6-45°C), estrés osmótico y actividad sobre el agua, síntesis de metabolitos caotrópicos, remoción de especies reactivas de oxígeno (ROS), y estrecho rango de pH. ⁽³²⁾ Es importante recalcar que la expresión de factores de virulencia de *A. fumigatus* está muy relacionado con la temperatura, por ejemplo, la temperatura corporal humana coadyuva en la mayor expresión de genes de virulencia con excepción de la catalasa tipo B ⁽³⁷⁾ Del mismo modo, los nutrientes que sean captados por el microorganismo jugaran un rol importante en la producción de moléculas de interés diagnóstico. La glucosa o sacarosa, extractos de levadura o malta y elementos trazas son reconocidos como influyente de la producción de muchos antibióticos del tipo betalactámico. ^(8, 28)

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos originados a partir de intermediarios de una gran variedad de rutas metabólicas primarias y se clasifican según sus precursores formados durante los primeros días de consumo de energía (trofofase). ^(10, 65) La producción de determinados metabolitos no es exclusiva de un género microbiano en particular; es por ello que cepas genéticamente semejantes producen

estructuras distintas y varían de acuerdo a diversas condiciones medioambientales, siendo tan diversas en estructura atómica como en actividad biológica. ^(1, 8, 12) *A. fumigatus*, así como diversas plantas de conocimiento medicinal, sigue siendo una fuente de innumerables compuestos orgánicos conocidos hasta la fecha alrededor de 226 metabolitos secundarios ⁽¹¹⁾ de los cuales se pueden dividir en policétidos: péptidos cíclicos, alcaloides y sesquiterpenoides; epipolythiodioxopiperazinas (ETP) teniendo a la gliotoxina como el primer y mejor caracterizado compuesto del grupo. ^(7, 25) Desde los primeros reportes de Numata y col. (1992), se caracterizaban policétidos como las fumiquinazolininas A, B y C las cuales son reconocidas por su actividad citotóxica ⁽³⁾ La gliotoxina es un alcaloide tipo ETP sintetizado por diversas especies del género *Aspergillus* con reconocida actividad antifúngica, la cual es generada como producto de la interacción hongo-hongo. De los aislamientos de *Aspergillus* spp. el 98% de cepas generaron esta toxina, en comparación al 96% de aislamientos ambientales. ⁽¹¹⁾

En ese sentido, diversos investigadores han obtenido resultados semejantes en la obtención de metabolitos con potencial de fármacos terapéuticos cuando el hongo es aislado de ambientes marinos o terrestres. ^(1, 3) Estos hongos endofíticos han sido ampliamente reconocidos como laboratorios biosintéticos de antibióticos (betalactámicos), antimicóticos, alcaloides, vasodilatadores, inmunosupresores, compuestos antitumorales y agentes anti esclerosis múltiple. ^(2, 6, 38)

La caracterización de los metabolitos secundarios de *A. fumigatus* puede partir de análisis cualitativos de grupos funcionales, hasta métodos más específicos y cuantificables como la cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) y la espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (MS-GC). La separación por fracciones, mediante la primera técnica, nos permite identificar compuestos que puedan expresar actividad antimicrobiana según la técnica de bioautografía. ⁽⁴⁾ Ambos métodos comparten el objetivo de caracterizar de manera cualitativa y cuantitativa un compuesto orgánico que será evaluado *in vitro* sobre un determinado género bacteriano. ⁽⁵⁾ Por ejemplo, compuestos con nombres genéricos como la fumifungina y el synerazol de actividad antimicótica e inhibidor de angiogénesis; hasta compuestos noveles como el 3,4-dimetoxifenol y el 1,3,5- trimetoxibenzeno con actividad sobre cocos Gram positivos y levaduras de importancia clínica. ⁽⁴⁾

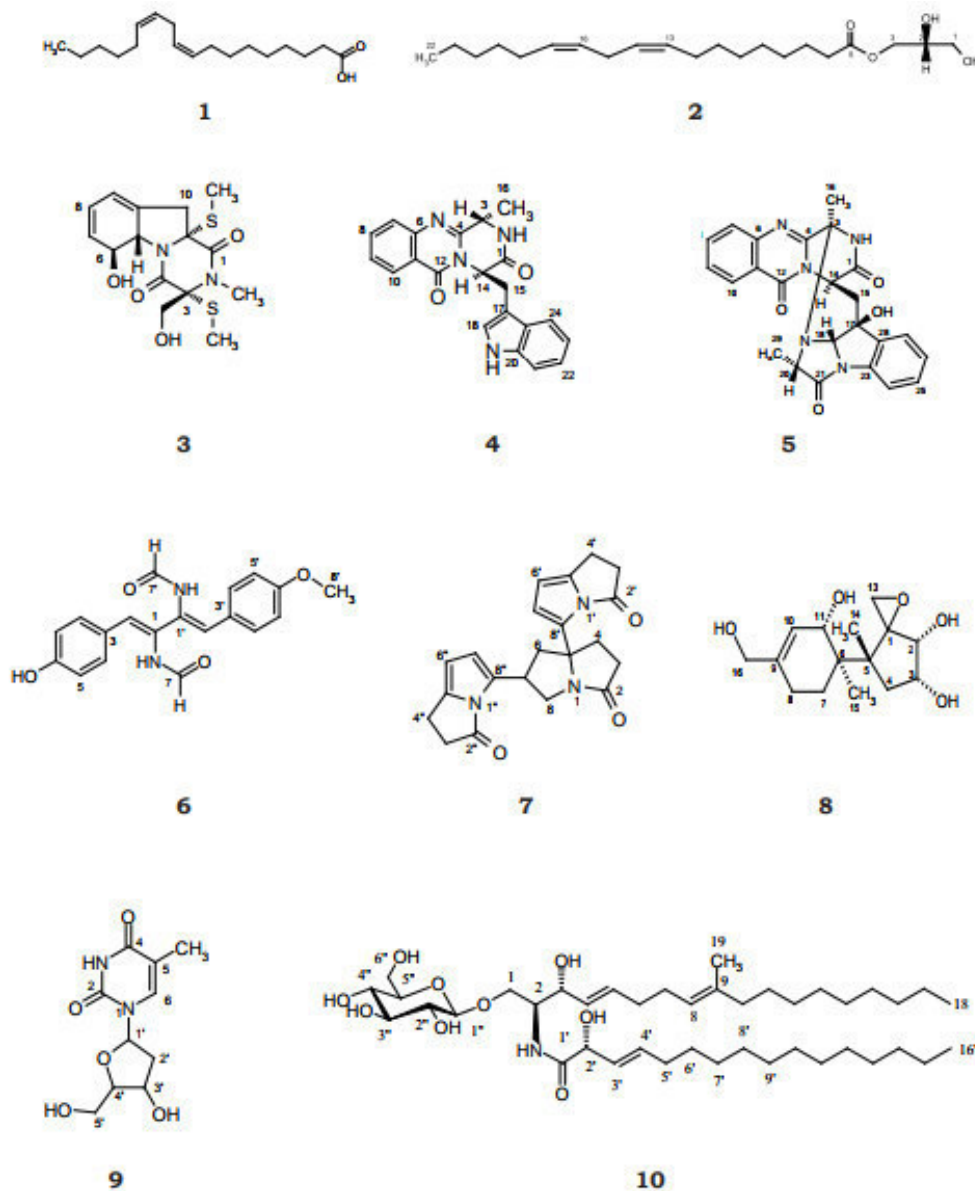
El rendimiento, en cuanto a masa y capacidad de extracción, depende del solvente orgánico a ser utilizado para la obtención de los metabolitos secundarios. Si se utilizan solventes apolares estos atraerán y tendrán mayor efecto de transporte sobre metabolitos de naturaleza polar. ⁽¹¹⁾ Los solventes orgánicos que han sido utilizados según la polaridad son los siguientes: de alta polaridad (éter de petróleo, éter) polaridad media (cloroformo, acetato de etilo, acetona, diclorometano) y baja polaridad (metanol, etanol, agua). ^(5, 7, 12) La composición del extracto orgánico de *A. fumigatus* es sumamente variada en cuanto a cantidad y presencia de antibióticos y quimioterapéuticos con actividad antimicrobiana, por lo que no es posible asignar individualmente la actividad a un compuesto orgánico en particular sobre una diana de la estructura bacteriana. Sugiriendo además que en este tipo de extractos puede existir efectos de sinergia o antagonismo entre los metabolitos secundarios. ⁽⁵⁾ Dependiendo de los compuestos presentes y según el tipo de solvente de extracción se podrá saber si estos actúan a nivel de la síntesis membrana celular, ácidos nucleicos u otro sitio de acción farmacodinámico. ⁽⁸⁾ Como señala Medensetv (1997) las quinonas y lactonas, debido a su naturaleza lipofílica, poseen efectiva acción antibacteriana sobre cocos Gram positivos; no siendo de la misma manera sobre la distinta estructura química de los bacilos Gram negativos. ⁽³⁹⁾

La mayoría de estudios utilizan como solvente de extracción al acetato de etilo con lo que llegan a describir la estructura y cantidad de los metabolitos secundarios presentes en el extracto y que haya sido demostrada su acción antimicrobiana mediante bioautografía. ^(13, 47) Para identificar las sustancias presentes del extracto se utiliza la técnica de GC-MS, donde el concentrado del extracto será separado mediante técnicas de cromatografía en columna obteniendo finalmente las fracciones que expresan actividad antimicrobiana las cuales serán caracterizadas mediante la medición a una determinada longitud de onda (280 nm) en función de la masa y carga. ^(5, 6) Shaaban y col (2012) aislaron una cepa endofítica de *Aspergillus fumigatus* R7 y mediante técnicas cromatográficas lograron purificar un extracto orgánico de los productos de fermentación de azúcares. ⁽⁷⁾ Por medio de técnicas de elucidación estructural y espectrometría de masas lograron identificar 10 compuestos bioactivos según estructura química y nomenclatura sistémica. (FIGURA 3)

Algunos de estos compuestos concuerdan con otras referencias. Por ejemplo, según Intaraudom y cols (2013) el compuesto 3, el cual fue obtenido de *Penicillium* sp posee actividad sobre *Mycobacterium tuberculosis* con valor de concentración mínima inhibitoria (MIC) de 48.8 ng/mL. Y acorde a Xu y cols (2011) el compuesto 10 posee

actividad antifúngica contra *Candida albicans*, además de poseer acción medicinal como antitumoral, inmunomodulador y citotóxico.

Figura 2: Metabolitos secundarios aislados de *Aspergillus fumigatus* R7



1.Ácido linoleico **2.** R(-)-monolinoleato de glicerol **3.** Bis-ditio-(bis-tio-metil)-gliotoxina **4.** Fumiquinazola-F **5.** Fumiquinazola-D **6.** (Z,Z)-N,N'-[1-[(4-Hidroxifenil)-metilen]-2-[(4-metoxi-fenil)metilen]-1,2-etanedil]-bis-formamida. **7.** trimero de pirazolin-3-ona **8.** Trico9-en-2a,3a,11a,16-tetraol **9.** 2'-deoxy-timidina **10.** Cerebrósido A.

Tabla 1: Clasificación de los grupos funcionales de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus*

GRUPO QUÍMICO		METABOLITO	ACCIÓN ANTIMICROBIANA	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
Alcaloides	Policétidos	Fumiquinazolina A-E	Citotóxico	7, 9, 11
		Fumigatinas	Gram positivos Gram negativos Nemátodos	9
		Pseurotinas	Antifúngico	9
		Restrictocinas	Invasividad	9
		3,4-dimethoxyphenol	Gram positivos	4
		1,3,5-trimethoxybenzene	Antifúngico Gram positivos	4
		Cumarina	Gram positivos	5
		Terreína	Gram positivos	5
	Sesquiterpenoides	Fumagilina	Tóxico	7, 9, 37
		Tripostatina A	Inhibidor ciclo celular	9
		Lactonas	Gram positivos	3
	Epipolitiodioxo-piperazines (ETP)	Gliotoxina	Toxina	7, 9, 61
Esteroles y Triterpenos		Ergosterol	Antiviral	9
		Ácido helvólico	Gram positivos Gram negativos	9, 37
		Ácidos grasos y politerpenos	Virulencia	9
		Fugitremorgina	Inhibidor ciclo celular	9, 37
		Cerebrósido A	<i>Candida albicans</i>	7

Metodología de extracción de metabolitos secundarios

La metodología de extracción de los metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus*, aislados de diversas fuentes naturales, así como la evaluación de su actividad antimicrobiana es semejante en los pasos críticos de aislamiento de la cepa y extracción de los compuestos orgánicos, diferenciándose en el uso de distintos insumos o técnicas para la purificación y evaluación de los mismos. Además, para la evaluación de la susceptibilidad de cepas bacterianas sensibles y resistentes se siguen los lineamientos de CLSI 2018. ⁽⁴⁰⁾

Tabla 2: Metodología de Evaluación de Actividad Antimicrobiana de *Aspergillus fumigatus* sobre el crecimiento *in vitro* de cepas bacterianas

<u>Etapas</u>		<u>Objetivo</u>	<u>Medio de cultivo</u>	<u>Condiciones de incubación</u>	
1°	Reactivación de la cepa de <i>Aspergillus fumigatus</i>		<ul style="list-style-type: none">• Reactivación del metabolismo• Identificación microscópica y macroscópica	<ul style="list-style-type: none">• Agar papa dextrosa (APD)• Agar Czapeck (CYA)	7 días a 25°C
2°	Obtención de cultivo monospórico		Concentración de 1x10 ⁶ conidios/mL.	<ul style="list-style-type: none">• Tween 80 al 1%• Medio SPG	7 días a 25°C
3°	Fermentación	Pre-inóculo	Fase exponencial del crecimiento	Caldo Sulfato Papa Glucosa (SPG)	5 días a T° ambiente
		Cultivo	Producción de metabolitos secundarios	Caldo SPG	15 días a T° ambiente
4°	Extracción de metabolitos secundarios		Extracción de metabolitos secundarios en fase acuosa	Acetato de etilo	Sistema al vacío acoplado a filtro de 110 mm
5°	Evaluación de actividad antimicrobiana		<ul style="list-style-type: none">• Evaluación de susceptibilidad sobre <i>S. aureus</i>• Evaluación de susceptibilidad sobre <i>S. pneumoniae</i>	<ul style="list-style-type: none">• Agar Mueller-Hinton• Agar Mueller-Hinton + sangre de carnero 5%	<ul style="list-style-type: none">• 16-18 horas a 35°C• 20 – 24 horas a 35°C

Fuente: Adaptado de Hernández P. (2012)

Las infecciones por cocos Gram positivos en tanto, continúan siendo un grave problema en salud pública debido a la capacidad para expresar diversos factores de virulencia en la comunidad como aquellas asociadas a la atención en salud: leucocidina Pantón – Valentine (PVL), enterotoxinas A-E y toxina del síndrome de choque tóxico producidas por *S. aureus*; mientras que *S. pneumoniae* presenta alta capacidad invasiva debido a la presencia de diversos polisacáridos capsulares y toxina pneumolisina. ⁽⁴¹⁻⁴³⁾ Por otro lado, es alarmante el aumento de la frecuencia de resistencia a antibióticos de cepas bacterianas comúnmente susceptibles a antibióticos de bajo espectro del grupo de los betalactámicos cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana.

S. aureus es ampliamente reconocido como microorganismo ubicuo de la piel y mucosas, así como de causante de bacteriemia con una tasa de mortalidad entre 15 a 60% principalmente en infecciones asociadas a la atención en salud o como causante del emergente problema de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA).⁽¹⁵⁾ Los mecanismos de resistencia a betalactámicos por *S. aureus* se pueden resumir en: resistencia mediada por enzimas (penicilinasas que desactivan el antibiótico), modificación de proteínas de unión a penicilina (PBP), y expresión del gen *mecA* cuyo producto es una proteína de unión a penicilina (PBP2a) con baja afinidad por esta clase de antibióticos la cual es causante de la resistencia a meticilina.⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾ A pesar de la mayor variedad genética y mayor virulencia en hospederos inmunocompetentes, las infecciones por *S. aureus* sensible a meticilina (MSSA) presentan menor carga de morbilidad en infecciones asociadas a la atención en salud en comparación al mayor impacto e incidencia por MRSA.⁽⁴²⁾ La cepa de *S. aureus* ATCC 25923, utilizada para las pruebas de sensibilidad a meticilina, se puede dividir en sensible (≥ 22 mm) o resistente (≤ 21 mm) según el criterio de interpretación del diámetro de inhibición el cual es generado por un disco con contenido de 30 ug de cefoxitina.⁽⁴⁰⁾

Tabla 3: *Staphylococcus aureus*: Resistencia a meticilina (MRSA) Región de las Américas

Países, territorios y otras áreas	Fuente de información	Resistencia (%)	Muestras aisladas	Tipo de vigilancia, población o muestras	Periodo de recolección	Año de reporte
Perú	Información nacional	36	230	Comunidades aisladas	2010	2013
Perú	Red nacional	84	380	Inclusivo	2012	2013

Fuente: Adaptado de OMS. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. 2014 (citado el 20/10/2018). Disponible en:
<https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>

De acuerdo a la OMS, las infecciones por *S. pneumoniae* (neumococo) han surgido como un grave problema en salud infantil ya que causa la muerte de 1,2 millones de niños menores de 5 años en países en vías de desarrollo⁽²³⁾. El neumococo puede encontrarse colonizando la nasofaringe en portadores sanos o como causante de sepsis, neumonía o meningitis; siendo la adquisición de resistencia a penicilina un factor que desencadene prolongación en la estadía hospitalaria y aumento en los niveles de mortalidad.⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾

La penicilina G, primera droga aislada de un hongo (*Penicillium notatum*), como betalactámico es el antibiótico de primera elección para el tratamiento de infecciones por

bacterias Gram positivas siempre y cuando el paciente no curse con alguna infección sistémica como la meningitis ya que el antibiótico no será capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. ⁽⁴⁸⁾ Su mecanismo de acción consiste en inhibir competitivamente las enzimas transpeptidasas de la última etapa de la síntesis de la pared celular. En el neumococo se han descrito 6 tipos de PBP (1a, 1b, 2a, 2b, 2x, 3), las cuales al ser alteradas fundamentalmente por transformación (2x, 2b, y 1a) son responsables de la resistencia a betalactámicos. ⁽⁴³⁾

Tabla 4: *Streptococcus pneumoniae*: Resistencia, o no susceptibilidad, a penicilina. Región de las Américas

Países, territorios y otras áreas	Fuente de información	No especificado resistente o no susceptible (%)	Muestras aisladas	Tipo de vigilancia, población o muestras	Periodo de recolección	Año de reporte
Perú	Información nacional	58.8	17	Comunidades aisladas	2010	2013
Perú	Red nacional	47	17	Inclusivo	2012	2013

Fuente: Adaptado de OMS. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. 2014 (citado el 20/10/2018). Disponible en: <https://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>

La actividad antimicrobiana está definida como la actividad biológica de un organismo sobre otro expresada como el potencial de inhibición que poseen los metabolitos secundarios de un hongo sobre el crecimiento de colonias bacterianas *in vivo* o *in vitro*; además de expresar la relación ecológica de los microorganismos en el medio ambiente por la competencia de nutrientes y superficies de desarrollo orgánico, y la producción natural de variados compuestos de interés farmacológico y clínico que pueden producir especies de hongos como *A. fumigatus*. Ante la continua y exponencial aparición de bacterias que expresan resistencia a antibióticos de bajo espectro para el manejo clínico de infecciones por agentes comensales e invasores del organismo humano, el desarrollo de nuevas drogas que logren ofrecer una alternativa para el tratamiento empírico podría expresarse en nuevos principios activos de valor farmacológico que disminuyan el desarrollo de fenotipos bacterianos que se expresan en farmacoresistencia, logrando así aminorar la carga de morbi-mortalidad por infecciones asociadas a la atención en salud y los costos médicos por tratamiento y hospitalización.

1.4.2. Definición de términos

- **Endofítico:** Especies de hongos ambientales que habitan internamente los tejidos vegetales para obtener nutrientes y hábitat.
- **Metabolitos secundarios:** compuestos químicos de estructura diversa, aromática y cíclica, los cuales no son indispensables para el funcionamiento del organismo que las produce. Son producidos por plantas y microorganismos.
- **Bioautografía:** Ensayo para la purificación de sustancias antibacterianas, o un fraccionamiento bioguiado, realizando el ensayo a través de cromatogramas que permitan la localización de los compuestos activos.
- **Micosis invasiva:** infección secundaria del sistema sanguíneo con presencia de conidias las cuales germinan e invaden otros tejidos superando las defensas inmunológicas celulares. Es producto de una aspergilosis con foco primario, como por el ejemplo, lesiones cavitarias del pulmón.
- **Cepa clínica:** aislamiento microbiano a partir de un espécimen clínico, posteriormente tipificado fenotípicamente y con reporte de susceptibilidad antimicrobiana por el laboratorio de microbiología. Almacenada en condiciones óptimas de temperatura y medio de conservación.
- **Principio activo:** sustancias químicas de diversa naturaleza molecular y grupo funcional responsables de la acción farmacológica y uso terapéutico.
- **Actividad antimicrobiana:** Capacidad de los principios activos producidos por microorganismos de destruir o inactivar otros microorganismos, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena.
- **Acetato de etilo:** solvente orgánico, líquido e incoloro de naturaleza polar. Soluble en compuestos de mediana a alta polaridad, inmiscible en agua a temperatura ambiente.
- **Extracción:** técnica de separación líquido-líquido permitiendo la transferencia de sustancias de una fase a otra. Es llevada a cabo entre dos líquidos inmiscibles en una pera de decantación.

1.4.3. Formulación de la hipótesis

Los metabolitos secundarios presentes en el extracto crudo de *Aspergillus fumigatus* poseen actividad antimicrobiana sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.

CAPÍTULO II

MÉTODOS

2.1. DISEÑO METODOLÓGICO

2.1.1. Tipo de investigación

Estudio observacional; analítico, transversal y prospectivo.

2.1.2. Muestra y muestreo

Se seleccionó por conveniencia una cepa clínica de *Aspergillus fumigatus* tipificada fenotípica y genotípicamente dentro de la sección *Fumigati*, la cual fue obtenida de un aislamiento clínico y se encuentra aislada en agar Sabouraud glucosado (ASG) en la micoteca de la sección de investigación del Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Tropical (IMT) “Daniel Alcides Carrión” de la Facultad de Medicina - Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Las 30 cepas de *Staphylococcus aureus* se dividen en: 15 cepas meticilino sensible y 15 cepas meticilino resistente, y 27 cepas de *Streptococcus pneumoniae*: 15 penicilino sensible y 12 penicilino resistente; las cuales fueron obtenidas a partir de aislamientos clínicos, cultivadas en medios microbiológicos y se encuentran conservadas en el cepario de la sección de Bacteriología del IMT de la UNMSM. Las cepas bacterianas fueron muestreadas por conveniencia según la disponibilidad en número y viabilidad de cultivo.

2.1.3. Variables

Variable dependiente

Cepas clínicas bacterianas según susceptibilidad antimicrobiana.

Variable independiente

Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios extraídos de una cepa clínica de *Aspergillus fumigatus*.

2.2. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

2.2.1. Obtención del extracto crudo de *Aspergillus fumigatus*

Reactivación de cepas clínicas de *Aspergillus fumigatus*

Para el procesamiento de fermentación líquida y extracción de metabolitos secundarios se escogió por conveniencia una cepa de *Aspergillus fumigatus* (AF) aislada de un paciente con micosis invasiva, foco primario de infección aspergiloma pulmonar, la cual

fue caracterizada fenotípica y genotípicamente mediante estudios de biología molecular y pertenece a la sección *Fumigati*. (Datos no publicados. Béjar y cols. 2014). La cepa de AF cuenta con una codificación previa como AF303.

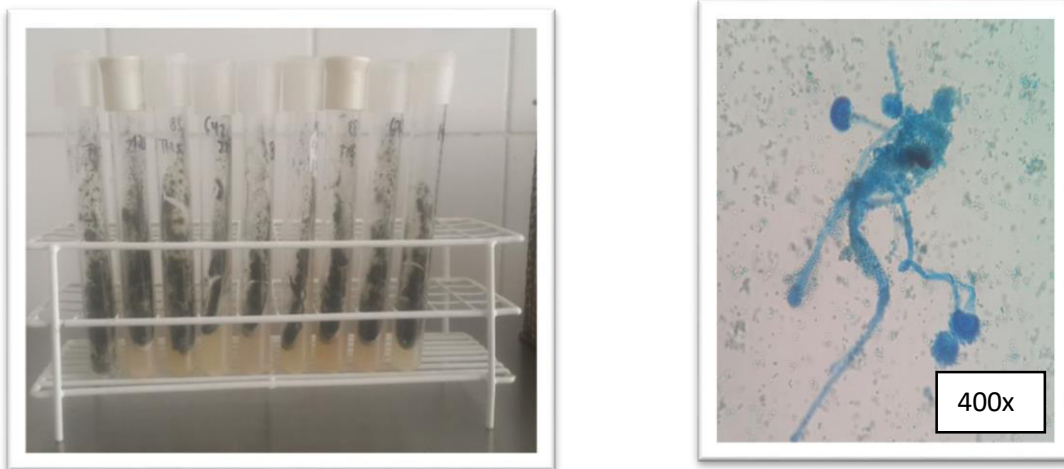
En condiciones de repetibilidad se siguió la misma metodología de fermentación, extracción y concentración para una cepa referencial de AF la cual sirvió como cepa control durante la evaluación antimicrobiana. Este control de calidad se utilizó con el fin de comparar los resultados con los antecedentes del estudio, demostrando además que la cepa control y la cepa clínica producen metabolitos secundarios mediante una misma metodología de extracción, y ambas poseen actividad antimicrobiana en diferente medida.

El aislamiento primario se conservaba en agar Sabouraud glucosado (ASG) en refrigeración, por lo cual se realizó una primera resiembra en agar papa dextrosa (APD) y se incubó por 7 días a 35° C. Transcurrido el tiempo señalado, se estudió las características macroscópicas y microscópicas (azul de lactofenol) que sean propias del género y especie, observando que el cultivo se encuentre sin presencia de contaminantes. Para la caracterización fenotípica se siguieron las recomendaciones de Samsom y Hoekstra⁽¹³⁾

Tabla 5: Características del cultivo del aislamiento clínico de *Aspergillus fumigatus*

Macroscopía	Microscopía
Colonias de 45 – 70 mm	Conidióforos lisos a finamente rugosos
Coloración del anverso verde - gris	200-300 um de largo
Coloración del reverso ocre	Hasta 7 um de diámetro
Sin pigmento difusible	Vesículas de 18 – 20 um de diámetro
Aspecto pulvurulento	Ausencia de métula
Relieve plegada - plano	Fiálides ampuliformes
Presencia de gotas de exudado	Conidias globosos 2-3 um

Figura 3: Características macroscópicas y microscópicas del aislamiento clínico de *Aspergillus fumigatus*.



Obtención del cultivo monospórico

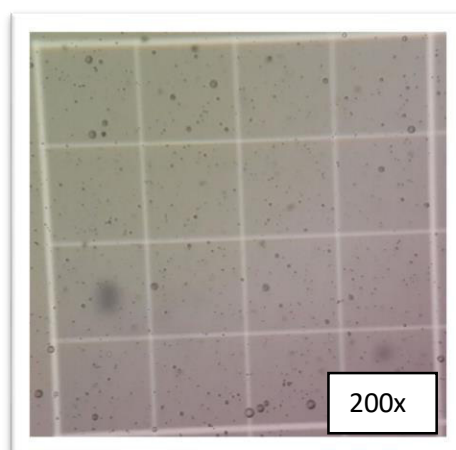
Como fase previa a la fermentación líquida del cultivo de AF se necesita que el mismo se encuentre en condiciones axénicas, lo que equivale a decir monospórico. Con esto se garantiza que los metabolitos que puedan expresarse pertenezcan a un solo tipo de colonia evitándose el pleomorfismo bioquímico y la variabilidad de las clonas fúngicas que podrían alterar la expresión de metabolitos secundarios. ^(5, 8)

La concentración de las conidias se encuentra en un rango de $1 \times 10^6 - 4 \times 10^6$ conidias/mL. Para ello se realizó un subcultivo en agar sulfato, papa, dextrosa (SPG) el cual fue incubado a 37°C por 7 días. Se preparó una solución Tween 80 al 1% y 10 mL fueron vertidos al subcultivo, se agitó la mezcla con ayuda de un vórtex y dejándose en reposo para un correcto desprendimiento de conidias de la superficie. En una batería de tubos con 4.5 mL de caldo peptonado se realizaron diluciones al medio con 0.5 mL de la resuspensión de conidias hasta alcanzar la concentración indicada previamente. Utilizando una cámara de Neubauer se realizó el recuento de conidias (2-3 μm de tamaño) (FIGURA 5) en los 9 cuadrantes y se determinó el recuento total según la fórmula descrita por Bauer (1986):

$$\frac{\text{Conidias}}{\text{mL}} = \frac{\text{conidias contadas}}{\text{área contada} \times \text{profundidad cámara} \times \text{dilución del recuento}}$$

$$2 \times 10^6 \text{ de conidias/mL} = \frac{180 \text{ conidias}}{9 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} \times 1/10000}$$

Figura 4: Recuento de conidias en cámara de Neubauer



Fermentación líquida

El proceso de fermentación se divide en: pre-fermentación y fermentación. Según la curva de crecimiento microbiano durante la primera fase el cultivo se encuentra en trofofase y en idiofase posteriormente. Con ello se garantiza que en primer lugar se agote la mayor cantidad de nutrientes del medio para que luego solamente se expresen los metabolitos de interés. ^(5, 29)

Para la pre-fermentación, en un matraz Erlenmeyer se añadió 45 mL de caldo SPG más el inóculo del cultivo monospórico y fue incubado a temperatura ambiente por 5 días en agitación constante de 120 rpm. Luego, el volumen fue transferido a un caldo SPG fresco de 250 mL llevándose a un tiempo de incubación de 7 días en las mismas condiciones de rotación y temperatura. En ambos casos se mantuvo una relación proporcional de 1/5 entre el volumen del caldo de cultivo y el volumen del matraz de Erlenmyer según las instrucciones de Damian y Daza. ⁽³⁹⁾

Culminado el tiempo de fermentación en medio líquido; el caldo de cultivo fue filtrado usando una bomba al vacío acoplado a un sistema estéril con filtro de poro de 0.22 μ m. La totalidad de la biomasa fue separada del caldo de cultivo comprobándose por la esterilidad del medio líquido al ser cultivado en agar APD, comprobando que el volumen filtrado estaba libre de conidias y micelio.

Extracción de metabolitos secundarios

Para la extracción orgánica del caldo de cultivo se utilizó el solvente de mediana polaridad, acetato de etilo, el cual posee mayor afinidad de transporte por los principios activos de naturaleza polar e incrementa la obtención de masa seca de metabolitos secundarios tras concentrar el extracto crudo. ^(5, 12) El acetato de etilo es un compuesto volátil e inflamable, de olor dulce y corrosivo al tacto; es por ello que se tomó en cuenta las condiciones básicas de bioseguridad en el manejo del solvente y en la conservación del mismo. (ANEXO 4)

En una pera de decantación se mezcló un volumen del caldo de cultivo más un volumen de acetato de etilo, realizando 3 lavados para un volumen final de 120 mL. Se agitó la suspensión vigorosamente para acelerar el proceso de transferencia de masas y se alcance el equilibrio de reacción según la ley de acción de masas. Dos fases fueron obtenidas tras la extracción: una fase orgánica y una fase acuosa. La primera consta del solvente de extracción el cual debe haber extraído los compuestos orgánicos; y la segunda que es el caldo de cultivo deficiente en metabolitos secundarios. Ambas fases fueron conservadas para la evaluación antimicrobiana por difusión en agar.

2.2.2. Caracterización química cualitativa del extracto crudo

La fase orgánica fue llevada a una estufa de aire circulante a 40°C para la evaporación del solvente de extracción y obtener una masa cruda de producción de metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios de AF pueden clasificarse, en consenso según las referencias bibliográficas, en 3 grupos orgánicos los cuales son: alcaloides, terpenos y esteroides, y sesquiterpenlactonas ⁽³⁾ los cuales abarcan una plétora de compuestos de distinta composición y formación molecular.

Identificación de alcaloides

Los alcaloides son el grupo químico más abundante que abarca los principales metabolitos secundarios de AF los cuales en mayor proporción son compuestos cíclicos derivados de aminoácidos o ácidos grasos. ⁽¹¹⁾ Para la identificación no específica de alcaloides se utilizó el reactivo de Mayer ($\text{HgCl}_2 + \text{KI}$ en 100 mL de agua) el cual forma un precipitado blanco a amarillo claro ante la presencia de alcaloides. Para la ecuación química de las reacciones con los controles positivos ver el ANEXO 5. Se siguieron las

recomendaciones del MSDS para el manejo de reactivos basados en mercurio. (ANEXO 4)

En un tubo de vidrio de 13x100 se vertió 0.5 mL del extracto crudo disuelto en etanol, y se añadió 3 gotas del reactivo de Mayer.

Identificación de terpenos y esteroides

La reacción de Libermann – Burchard reconoce la presencia de triterpenos y esteroides los cuales se caracterizan por poseer un núcleo androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

En un tubo de vidrio de 13x100 se añadió 0.5 mL del extracto crudo con 1 mL de anhídrido acético, finalmente se añadió 3 gotas de H₂SO₄ (c). Se siguieron las recomendaciones del MSDS para el manejo de ácido sulfúrico. (ANEXO 4). La reacción se considera positiva por la formación de un anillo verde-azul hasta uno pardo anaranjado. Para la ecuación química de las reacciones con los controles positivos ver el ANEXO 5.

Identificación de sesquiterpenlactonas

Son estructuras terpénicas que poseen 15 átomos de carbono, incluyendo una lactona α - β insaturada. Para su identificación se recomiendan los reactivos de Baljet, Legal, vainillina – ácido ortofosfórico y el yodo elemental. La presencia puede medirse cualitativamente o cuantitativamente. Para la última técnica se utiliza cromatografía en capa fina usando como reactivo revelador los insumos anteriormente mencionados.

Reacción de Legal: a 0.5 mL del extracto crudo se añadió 3 gotas del reactivo de Legal (nitroprusiato de sodio) hasta la formación de una coloración rojo intenso. Para la ecuación química de las reacciones con los controles positivos ver el ANEXO 5.

2.2.3. Evaluación antimicrobiana

Reactivación de cepas clínicas

Las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* (Sau) y *Streptococcus pneumoniae* (Spn) fueron gentilmente brindadas por el laboratorio de Bacteriología del Instituto de Medicina Tropical – UNMSM, y se encuentran conservadas en bacterioteca en condiciones adecuadas según las exigencias nutritivas y de preservación de cada género bacteriano. Las cepas de Sau se conservan en caldo tripticasa de soya (TSA) más glicerol al 20%, y las cepas de Spn en crioperlas; ambas a una temperatura de -70°C.

Para la evaluación antimicrobiana del extracto crudo de AF, una población de 60 cepas bacterianas fue muestreada por conveniencia según la disponibilidad y exigencia de cultivo. La muestra fue distribuida por género y especie según la susceptibilidad antibiótica previamente tipificada por el IMT según especificaciones internacionales:

- 15 cepas de *Sau* meticilino sensible (MSSA; Halo de inhibición por cefoxitina \geq 22 mm)
- 15 cepas de *Sau* meticilino resistente (MRSA; Halo de inhibición por cefoxitina \leq 21 mm)
- 15 cepas de *Spn* penicilino sensible (PSSP; MIC \leq 0.06 ug/mL)
- 12 cepas de *Spn* penicilino resistente (PRSP; MIC \geq 2 ug/mL)

La codificación de las cepas fue realizada por el autor la cual consiste en la distribución según susceptibilidad (MSSA, MRSA, PSSP y PRSP, sumado a la numeración asignada con anterioridad por el consultorio externo. Ejemplo: MRSA-3789.

Según la estandarización del desempeño para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana del CLSI ⁽⁴⁰⁾ se cumplieron las recomendaciones para la normalización de la reactivación de las cepas bacterianas y de la preparación de los medios sólidos de susceptibilidad. Ambas cepas fueron reactivadas en agar base sangre adicionando 5% de sangre carnero al volumen total del agar (ASC) realizando dos subcultivos consecutivos de 24 h a 35 \pm 1°C con la finalidad de obtener cultivos frescos y se conserven las características fenotípicas y genotípicas de las colonias.

Estandarización de los medios de susceptibilidad

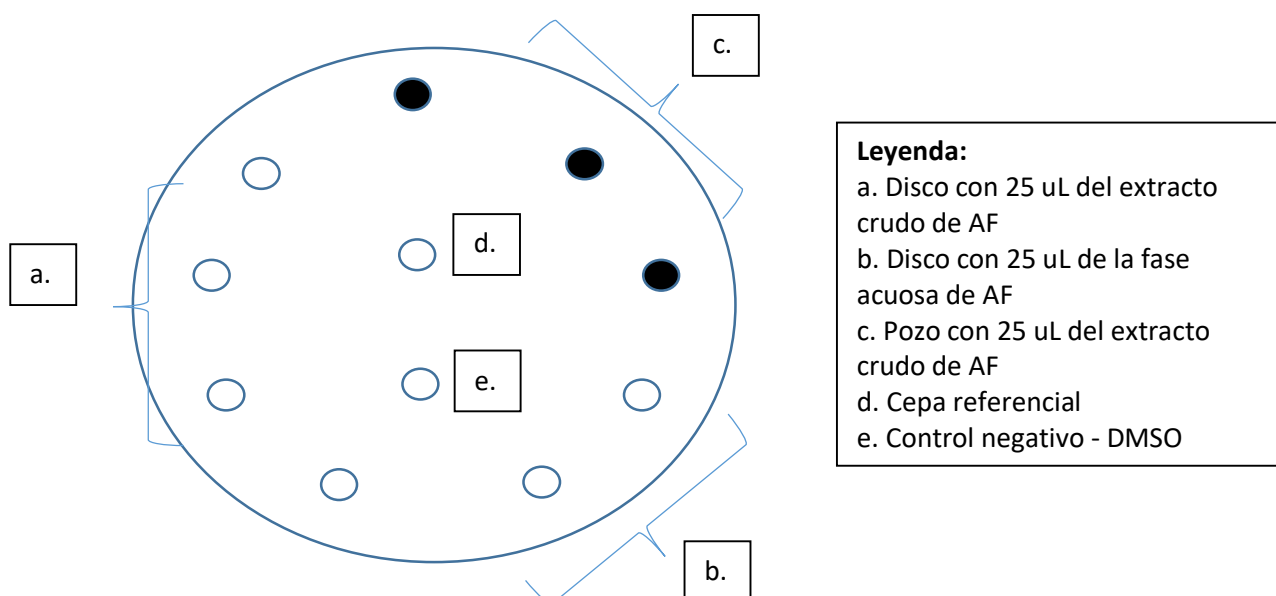
Para la evaluación de susceptibilidad en *Sau* se preparó el agar Muller-Hinton (MH) con un pH de 7.3 \pm 0.1, profundidad de 4 mm, esterilidad a 37°C por 24 horas, y aspecto ámbar y transparente.

Para la evaluación de susceptibilidad en *Spn* se preparó el medio MH con 5% de sangre de carnero (MUSA) cumpliendo con el desempeño de hemólisis de cepas estándares y esterilidad a 37°C por 24 horas.

Se utilizó un sacabocado de metal el cual realiza una perforación de 6 mm de diámetro y 4 mm de profundidad en los medios sólidos. Se prepararon discos estériles en blanco (Whatman N° 42) de 6 mm de diámetro los cuales fueron impregnados con 25 uL del extracto crudo de AF por triplicado, concentrado en unidades de 100 mg/mL utilizando

DMSO 5%. Se dejaron secar por 15 minutos y se conservaron en congelación a -20° C listos para ser usados a demanda. Igualmente, se impregnaron discos control con 25 uL del extracto crudo de una cepa referencial de AF en la misma concentración.

Figura 5. Plantilla para la evaluación antimicrobiana en Mueller-Hinton



Controles de calidad

Se tomaron medidas preventivas que aminoren el sesgo de evaluación de la actividad antimicrobiana por efecto del extracto crudo de AF. El posible sesgo que pueda originar el solvente orgánico, acetato de etilo, durante la evaluación antimicrobiana fue eliminado al evaporar completamente el solvente de extracción usando un sistema de circulación por aire forzado en estufa de aire circulante a 40°C.

El extracto fue solubilizado en dimetilsulfóxido (DMSO) 5% para que pueda ser inoculado tanto en discos como en pozos. Por ello, se inoculó un disco de 6 mm con DMSO 5% usando el mismo volumen de evaluación del extracto crudo por triplicado. Este será el control negativo. Se utilizó la difusión en disco al ser la técnica más reconocida y estandarizada que la difusión en pozo.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de una cepa control de AF obtenida del Instituto Nacional de Salud. No fue considerada como un control positivo ya que, al no ser una metodología estandarizada, no es predecible su actividad antimicrobiana. La producción de metabolitos dependerá de cada cepa según el origen, número de resiembras,

condiciones bióticas y abióticas de fermentación, etc. Por lo tanto, su evaluación permitió demostrar que no solo la cepa clínica, objeto de estudio, es capaz de producir principios activos. De igual modo, fueron impregnados 25 uL del extracto de esta cepa en disco de 6 mm.

Finalmente, se evaluó la actividad de inhibición del crecimiento bacteriano producido por la fase acuosa del volumen de fermentación. Esta fase es el medio de cultivo líquido, SPG, inmiscible con el solvente de extracción. Por teoría, los compuestos extracelulares no deberían encontrarse en esta fase. Se considera igualmente un control negativo, y fue inoculado un volumen de 25 uL en discos de 6 mm por triplicado.

Susceptibilidad por difusión en agar

Para la preparación del inóculo en solución salina estéril, se obtuvo una concentración de 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/mL) utilizando cultivos frescos no mayores a un tiempo de incubación de 24 horas a $36 \pm 1^\circ \text{C}$. Se impregnó un hisopo estéril con el inóculo estandarizado y se sembró por la técnica de tapete en 3 direcciones cubriendo todo el medio sólido. Para Sau se utilizó el medio MH, y para Spn el medio MUSA. Dentro del lapso de 15 minutos se realizaron los pozos y colocaron los discos al agar. Finalmente, fueron incubados en estufa de $36 \pm 1^\circ \text{C}$ por 24 horas. Todas las cepas clínicas y cepas control fueron procesadas de la misma manera.

2.2.4. Lectura e interpretación de resultados

Los resultados fueron expresados según la variable cualitativa de presencia o ausencia de actividad antimicrobiana, la cual se manifiesta como cualquier halo de inhibición del crecimiento bacteriano producido alrededor del pozo o disco. Se consideró la presencia de actividad antimicrobiana un halo de inhibición mayor de 6 mm. Por consiguiente, ausencia de halo de inhibición indica que no existe actividad antimicrobiana.

Usando un vernier se medirá el diámetro de los halos de inhibición en milímetros con la finalidad de crear una base de datos la cual permita realizar el análisis estadístico.

Estos resultados no podrán ser comparados con los puntos de corte de susceptibilidad en disco por difusión en agar propuestos por el manual M100-S28 del CLSI. ⁽⁴⁰⁾

2.3. ANÁLISIS DE DATOS

Se utilizó el programa Microsoft Excel 2013 para la construcción de una base de datos la cual permitió realizar la descripción de las variables cualitativas y cuantitativas. Utilizando una tabla de valores absolutos y relativos para el análisis univariado de los resultados en relación a la presencia o ausencia de halos de inhibición. Para cada una de las cepas de *A. fumigatus*, se consideró como valor absoluto la presencia o ausencia de inhibición de crecimiento siempre y cuando dos de tres resultados relativos presenten el mismo valor. Se efectuó el mismo procedimiento por separado por cada una de las cepas bacterianas que sean sensibles o resistentes.

Así mismo, se usó el paquete de *software* estadístico *Minitab* v14.0 donde se realizó la prueba de hipótesis para cociente de varianzas con una significancia valor $p < 0.05$ para comparar las desviaciones estándar entre la difusión en pozo y disco de las 4 muestras de cepas clínicas; igualmente se comparó los promedios de los halos obtenidos por disco difusión entre las cepas sensibles y resistentes. Finalmente se agrupó la información utilizando el método para datos paramétricos de Tukey con un nivel de confianza de 95% con lo cual se obtuvo la comparación múltiple de medias de los pozos y discos entre las muestras de cepas clínicas.

2.4. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Por la naturaleza del estudio no se manejaron consideraciones éticas ya que no se trabajó con grupos humanos directamente sino con especímenes, los cuales fueron aislados con anterioridad en establecimientos de salud, fueron codificados sin mencionar datos personales, y se encuentran conservados en medios microbiológicos en los laboratorios del IMT. Ya que no se afectará la integridad física, emocional y privada de la persona no se presentó este estudio ante un comité de ética institucional.

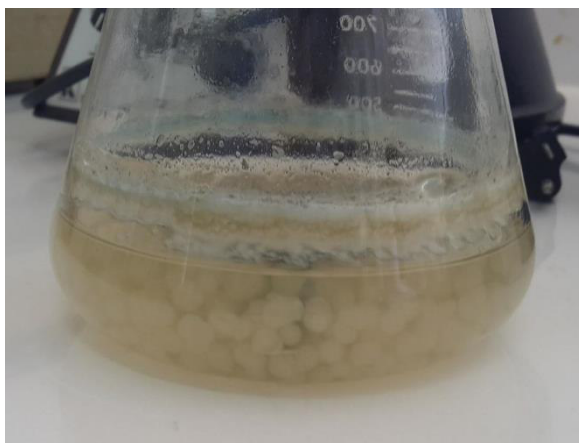
CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE AF

Se aplicó el mismo protocolo de fermentación líquida para las cepas AF303 y cepa referencial, ambas en iguales volúmenes de caldo SPG según la técnica de Damián y Daza. Durante la fase de fermentación propiamente dicha, se observó el crecimiento de gran cantidad de biomasa en forma de pellets o bolas fúngicas (FIGURA 6) las cuales son producto de la germinación de las conidias aún presentes en el medio de cultivo. Esta biomasa fue finalmente filtrada usando una gasa estéril, con la finalidad de filtrar únicamente el caldo de cultivo usando un filtro de 0.22 μm en un sistema al vacío.

Figura 6: Biomasa de fermentación líquida de *Aspergillus fumigatus*



Como los metabolitos secundarios se encuentran en la fase orgánica, esta fue llevada a una estufa de aire circulante a 40° C a fin de evaporar el solvente de extracción. Obtenido el extracto crudo de ambas cepas de AF, estas fueron caracterizadas según la tabla 6 indicando los volúmenes, peso seco y unidades de concentración.

Tabla 6: Características físicas de las fases orgánicas de AF

Extracto crudo de AF	Filtrado recuperado (mL)	Extracto seco (mg)	Unidades de concentración (mg/mL)
AF 303	600	182	100
Cepa referencial	500	168	100

3.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA CUALITATIVA

Para la determinación cualitativa de los grupos funcionales se utilizaron diferentes metodologías que evidencian en una escala semicuantitativa la naturaleza de los metabolitos secundarios más abundantes de AF. Se encontró la presencia de alcaloides, y esteroides y triterpenos, mas no se detectó la presencia de sesquiterpenlactonas.




Tabla 7: Resultados de la caracterización química del extracto crudo de AF 303

Metabolitos secundarios	Reactivo de ensayo	Reacción
Alcaloides	Mayer	+++
Esteroides insaturados y triterpenos	Lieberman-Burchard	++
Sesquiterpenlactonas	Legal	-

Interpretación

(-) Negativo, (+) Baja evidencia, (++) Evidencia, (+++) Alta evidencia

Figura 7: Resultados de las reacción de caracterización cualitativa química del extracto crudo de AF303

Reacción de Mayer	Reacción de Liebermann-Burchard	Reacción de Legal
 <p>(3+)</p>	 <p>(2+)</p>	 <p>(-)</p>

3.3. EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA

Sobre *Staphylococcus aureus*

El extracto crudo de AF303 concentrado en 100 mg/mL usando un volumen de 25 uL tanto por difusión en disco y pozo, inhibió el crecimiento *in vitro* de las 30 cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. La presencia de actividad antimicrobiana del extracto se evidenció por un halo de inhibición mayor de 6 mm, lo cual se obtuvo en el 100% de cepas clínicas de *S. aureus*. (TABLA 8)

Tabla 8: Promedio de los diámetros de inhibición producidos por el extracto crudo de AF303 sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*.

Códigos	Diámetro de inhibición en MSSA (mm)		Códigos	Diámetro de inhibición en MRSA (mm)	
	Disco 6 mm	Pozo 6 mm		Disco 6 mm	Pozo 6 mm
3528	23.6	27.3	3421	22.3	24.3
3920	25	28	3492	22.3	25.7
3718	21.6	20.7	3217	20.7	23
3735	24.6	23.7	3701	23	24.7
3564	27	29.3	c-3741	21	23
3273	27.3	29.7	3363	30	35.3
3739	24	24.3	2018	33.3	37.3
3718	21.6	22.3	c-3491	21	22.3
3925	25.3	27.3	1993	34	35.7
3567	25.3	23	6288	22.3	22.3
2234	20.6	20.6	c-3629	23	22.3
2980	20.3	24	c-3704	18.7	25.3
2999	26.3	31.3	2343	20	21
3029	26.7	27	7898	21	22.7
7721	20.7	20.7	4532	21.7	23.3

MSSA: *Staphylococcus aureus* meticilino sensible MRSA: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente **AF303**: extracto crudo de cepa clínica de *Aspergillus fumigatus*.

La cepa *S. aureus* ATCC 25923, la medida del diámetro del halo de inhibición por difusión en pozo, por triplicado, fue de 22.45 +/- 0.58 mm. En el caso de difusión en disco fue de 20.67 +/- 0.57 mm. Para el control de calidad los discos control negativo (DMSO 50% y fase acuosa del volumen de fermentación) no mostraron actividad antimicrobiana (halo de inhibición igual a 6 mm) sobre ninguna cepa de Sau. La cepa referencial de AF obtuvo un promedio de diámetro de halo de inhibición de 23.87 +/- 3.25 mm sobre las cepas sensibles de Sau, y de 22.27 +/- 5.81 mm sobre las cepas resistentes. Para la cepa ATCC 25923 el diámetro único fue de 20 mm.

Del grupo de *S. aureus* sensibles a la meticilina para la metodología utilizando difusión por pozo se encontró una media de 25.49 +/- 3.31 mm; y según la metodología de disco este fue de 24.02 +/- 0.57 mm. Utilizando la prueba de hipótesis para cociente de varianzas con un nivel de significancia de 5% se rechaza la hipótesis nula, y se acepta la hipótesis alterna por lo cual las desviaciones estándar obtenidas por ambos métodos son distintas. (Valor $p < 0.05$) Por lo tanto, comparando promedios y asumiendo varianzas diferentes, para la prueba hipótesis se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna donde el promedio en milímetros de los halos de inhibición obtenidos por pozo difusión es mayor al promedio obtenido en milímetros por difusión en disco.

En el caso de *S. aureus* resistentes a meticilina se obtuvieron promedios de 25.89 +/- 5.35 mm y 23.62 +/- 4.68 mm, según el método de difusión en pozo y disco respectivamente. En este caso, se aplica la prueba de hipótesis para comparar la relación de desviaciones estándar con un IC de 95%. Por lo tanto, no se rechazó la hipótesis nula la cual señala que las desviaciones estándar de los grupos obtenidos por difusión en pozo y por disco son iguales. (valor $p > 0.05$). Sin embargo, cuando se compara el promedio y se asumen varianzas diferentes para ambos grupos, se rechazó la hipótesis nula y por consiguiente se asume la hipótesis alterna donde el promedio en milímetros de los halos de inhibición obtenidos por pozo difusión es mayor al método por disco difusión. (Valor $p < 0.05$)

Igualmente, se evaluó si existe diferencia significativa entre el promedio de halos obtenidos por disco difusión sobre cepas sensibles contra el promedio obtenido por disco difusión en cepas resistentes. Se realizó una estimación de la diferencia entre ambos grupos, luego mediante prueba de hipótesis entre los promedios de los *S. aureus* sensibles y resistentes, con un nivel de significancia de 5% no se rechazó la hipótesis nula que dice

que el promedio en milímetros de los halos de inhibición sobre cepas sensibles no es mayor al promedio de cepas resistentes halladas por disco difusión. (Valor de p: 0.308)

Tabla 9: Actividad antimicrobiana del extracto crudo de AF303 sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>	Cepa referencial AF Extracto crudo	AF 303 Extracto crudo		Control negativo	
	Disco (mm)	Pozo (mm)	Disco (mm)	DMSO 5% (mm)	Fase acuosa (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	20	22.45 +/- 0.58	20.67 +/- 0.57	6	6
MSSA	23.87 +/- 3.25	25.49 +/- 3.31	24.02 +/- 2.51	6	6
MRSA	22.27 +/- 5.81	25.89 +/- 5.35	23.62 +/- 4.68	6	6

Sobre *Streptococcus pneumoniae*

El extracto crudo de AF303 con una concentración de 100 mg/mL, el cual fue inoculado a un disco y pozo de 6 mm usando un volumen de 25 uL y realizando 3 mediciones, inhibió el crecimiento *in vitro* de la totalidad de cepas clínicas de *Streptococcus pneumoniae*. La presencia de actividad antimicrobiana del extracto se evidenció por un halo de inhibición mayor de 6 mm, lo cual se obtuvo en el 100% de cepas clínicas de neumococo.

En esta oportunidad no se utilizó una cepa control de *S. pneumoniae* ATCC 25923. Igualmente, para el control de calidad los discos control negativo (DMSO 5% y fase acuosa del volumen de fermentación) no mostraron actividad antimicrobiana (halo de inhibición igual a 6 mm) sobre ninguna cepa de *S. pneumoniae*.

Tabla 10: Promedio de los diámetros de inhibición producidos por el extracto crudo de AF303 sobre cepas clínicas de *Streptococcus pneumoniae*.

Códigos	Diámetro de inhibición en PSSP (mm)		Códigos	Diámetro de inhibición en PRSP (mm)	
	Disco 6 mm	Pozo 6 mm		Disco 6 mm	Pozo 6 mm
O:32	33.2	29.7	O:128	24.7	30
O:15	18.7	23	9CH	27	28
O:54	26.3	34	35CH	28.7	34
8C	22	26.3	61CH	29.7	30
29H	19.7	23.7	75CH	30.3	37.6
8H	28.3	31	1B	25	24.7
33C	24.3	25	29B	20.3	20
39CH	29	31.7	34B	20.3	21
O:55	27.3	31	123B	22	26
O:91	22.3	32.7	124B	21	21.7
O:22	23.3	34.3	12C	28.7	31.7
60CTE	27.7	39.7	99H	39.3	36.7
6CH	30.7	30			
3B	26.7	30			
151B	28.7	32.7			

PSSP: *Streptococcus pneumoniae* penicilino sensible **PRSP:** *Streptococcus pneumoniae* penicilino resistente **AF303:** extracto crudo de cepa clínica de *Aspergillus fumigatus*

Al igual que el procesamiento de cepas de *S. aureus*, se evaluó la actividad de una cepa referencial de *A. fumigatus* solamente por disco difusión. Se obtuvo una media de 26.07 +/- 4.08 mm sobre las cepas sensibles, y una media de 26.67 +/- 5.38 mm para las cepas resistentes de neumococo.

Al evaluar el extracto orgánico sobre cepas de neumococo sensibles a penicilina, se obtuvo un promedio de 30.31 +/- 4.39 mm utilizando el método de pozo difusión. Por otro lado, según disco difusión el promedio fue de 25.82 +/- 4.05 mm. Primero se analizó

la comparación de promedios entre ambos métodos de difusión, pozo y disco. Se aplicó la prueba de hipótesis para diferencia de medias donde se rechazó la hipótesis nula y se tomó en cambio la hipótesis alterna por la cual el promedio de inhibición por pozo en milímetros es mayor que el promedio de inhibición por disco. (Valor p: $0.000 < 0.05$)

Finalmente, para las cepas resistentes de neumococo se obtuvo un promedio de 28.44 ± 5.84 mm por difusión en pozo; y un promedio de 26.5 ± 5.39 mm por difusión en disco. Al comparar los promedios de ambas metodologías se acepta la hipótesis alterna y se rechaza la hipótesis nula por lo que el promedio de inhibición por pozo difusión hallado en milímetros no es mayor que el promedio hallado por disco difusión. (valor p : $0.065 > 0.05$) Y para la comparación de desviaciones estándar no se rechaza la hipótesis nula, es decir, las desviaciones estándar en ambos grupos de difusión en agar son las mismas. (valor p: $0.372 > 0.05$)

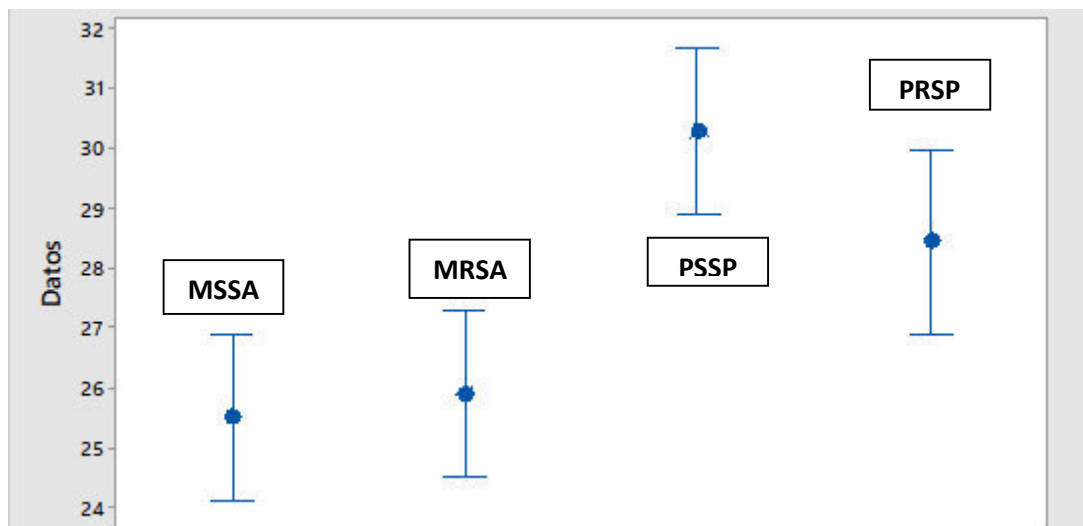
Tabla 11: Actividad antimicrobiana del extracto crudo de AF303 sobre cepas de *Streptococcus pneumoniae*

<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Cepa referencial AF Extracto crudo	AF 303 Extracto crudo		Control negativo	
	Disco	Pozo	Disco	DMSO 5%	Fase acuosa
PSSP	26.07 ± 4.08 mm	30.31 ± 4.39 mm	25.82 ± 4.05 mm	6 mm	6 mm
PRSP	26.67 ± 5.38 mm	28.44 ± 5.84 mm	26.5 ± 5.39 mm	6 mm	6 mm

Para evaluar las diferencias entre los promedios hallados por disco difusión entre las cepas sensibles y resistentes de *S. pneumoniae* se aplicó la prueba de hipótesis donde no se rechazó la hipótesis nula, es decir, el promedio de los halos de inhibición obtenidos sobre cepas sensibles de neumococo no es mayor al promedio obtenido sobre las cepas resistentes por disco difusión para ambos grupos. (valor p : $0.707 > 0.05$)

En resumen, la distribución de los halos de inhibición antimicrobianos obtenidos por la difusión por pozo del extracto crudo, sobre cepas de *S. aureus* y *S. pneumoniae*, presentó una distribución normal, por ello se aplicó a esa totalidad de datos la prueba de Tukey con un intervalo de confianza de 95%. La FIGURA 8 analiza la comparación múltiple de medias obtenidas por pozo difusión sobre las 4 variables de bacterias sensibles y resistentes. Por lo tanto, la gráfica de intervalos de cada variable expresa una media del total de datos analizados por grupo; donde los datos agrupados se consideran significativamente iguales. Las medias que no comparten una agrupación son significativamente diferentes, como la figura indica para *S. aureus* sensible y *S. pneumoniae* sensible.

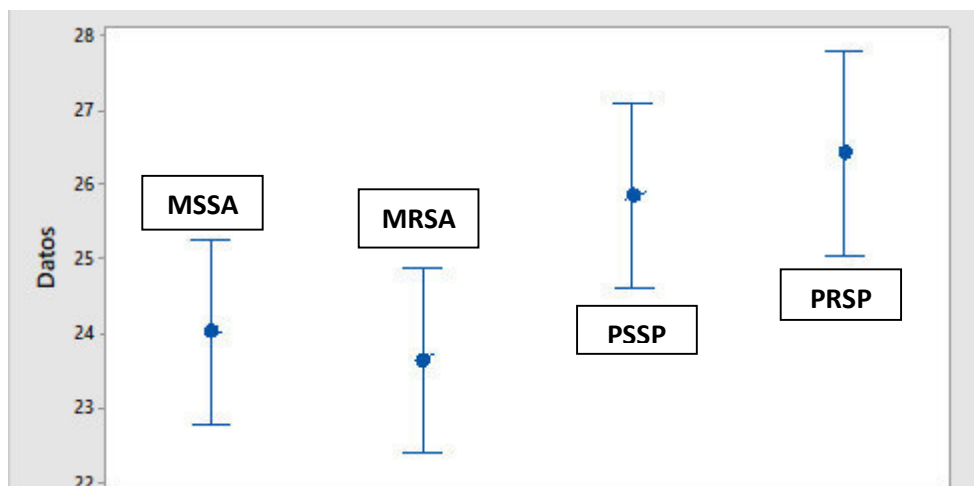
Figura 8: Intervalos de los diámetros de inhibición antimicrobiana por difusión en pozo sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.



MSSA: *Staphylococcus aureus* meticilino sensible, MRSA: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, PSSP: *Streptococcus pneumoniae* penicilino sensible, PRSP: *Streptococcus pneumoniae* penicilino resistente.

Del mismo modo se determinó la distribución de halos de inhibición mediante disco difusión de 6 mm sobre ambos grupos de cepas clínicas. Mediante la prueba de estadística paramétrica, la prueba de Tukey determina con un nivel de confianza de 95% que solamente las medias obtenidas sobre las cepas resistentes de *S. aureus* y *Streptococcus pneumoniae* son significativamente diferentes.

Figura 9: Intervalos de los diámetros de inhibición antimicrobiana por difusión en disco sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.



MSSA: *Staphylococcus aureus* meticilino sensible, MRSA: *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, PSSP: *Streptococcus pneumoniae* penicilino sensible, PRSP: *Streptococcus pneumoniae* penicilino resistente.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio en la región el cual evalúa la extracción de principios activos provenientes de una cepa clínica de AF, ya que estudios previos han tomado como muestra hongos ambientales provenientes de suelos y plantas (endofíticos).^(1, 4, 5, 12, 13, 14) La importancia de considerar las diferencias entre cepas ambientales y clínicas de AF recae en resaltar las distintas interacciones entre la formación de metabolitos secundarios y las características del medio donde los hongos se desarrollan; además de factores genéticos intrínsecos de cada especie.⁽⁴⁾ Los metabolitos secundarios, presentes en el extracto crudo, de la cepa proveniente de micosis invasiva (AF 303) presentaron actividad antimicrobiana sobre la totalidad de cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.

Los hongos AF provenientes de medios naturales condicionan la expresión de metabolitos secundarios a la interacción entre factores abióticos (temperatura, pH, salinidad, nutrientes, metales trazas, luz solar) y factores bióticos (microorganismos depredadores y competidores). Por otro lado, si bien es cierto que un AF causante de micosis invasiva está influenciada por factores abióticos y bióticos, estos cambian drásticamente según el medio interno humano; donde los factores abióticos están determinados por las condiciones en homeostasis (37°C, pH 7.35 – 7.45, bioelementos) y los factores bióticos formado por células y tejido, y la respuesta celular y humoral del sistema inmunológico. En el presente estudio se muestra una media estadística superior a la mayoría de estudios donde evalúan cepas ambientales, lo cual difiere de la hipótesis donde señalan que un hongo pierde la propiedad de generar metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana al encontrarse fuera de su planta hospedera^(8, 56, 57)

En cuanto a la actividad sobre cepas sensibles y resistentes no se encontró diferencia estadística ya que el diámetro del halo de inhibición entre ambos grupos fue semejante. Como la mayoría de estudios previos han usado como muestra cepas ATCC, las cuales poseen un perfil de sensibilidad a la mayoría de antibióticos, no es posible comparar los resultados obtenidos sobre las cepas clínicas entre las cepas ATCC.

Una explicación tentativa para estos resultados es que los metabolitos secundarios de AF no poseen los mecanismos de acción propios de los antibióticos betalactámicos, sino estos estarían dirigiendo su acción sobre otros sitios diana de las bacterias. El objetivo general de la tesis fue evaluar si estos metabolitos poseen o no actividad antimicrobiana sobre cepas bacterianas; por ende, esta actividad se evidencia desde el mínimo halo de

inhibición mayor de 6 mm. Otros estudios han tomado como punto de corte un diámetro mayor a 9 ⁽³⁸⁾, 10 ⁽³⁾ y 12 mm, ⁽⁴⁾ lo cual se relaciona con un tamaño mayor al disco blanco que han utilizado para inocular sus extractos.

La mayor parte de las referencias bibliográficas han utilizado cepas ATCC como un estudio preliminar donde se garantiza una correcta identificación de la cepa bacteriana en cuanto a fenotipo y genotipo, producto liofilizado y estandarizado en su conservación, menor número de pasajes o subcultivos en comparación a una muestra clínica, etc. Es por ello que la interpretación de los datos es complicada en tanto se compare la actividad antimicrobiana por difusión en disco sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ya que estos muestran dispersión según los antecedentes. En este estudio se determinó un diámetro de inhibición por difusión en disco una media de 20 mm.

El rango de halos de inhibición según los antecedentes varían desde 12 mm ^(7, 49) a 30.3 mm ⁽³⁾; siendo también ausente la actividad antimicrobiana ⁽¹⁴⁾. Los hallazgos de este estudio son consistentes con Valgas y cols ⁽⁵¹⁾, y con Kalyani P y Hemalatha K ⁽⁵⁰⁾ quiénes utilizando una concentración de 100 mg/mL obtuvieron una media del halo de inhibición sobre Sau ATCC 25923 de 20 y 18 mm. Como indicaba Segura, 2006 ⁽⁶²⁾ la concentración basal de extracto crudo solubilizado para ser inoculada en los discos es de 2 mg/mL, por lo que magnitudes inferiores no tendrán efecto antimicrobiano. ^(4, 8) En relación a la elección de la concentración única para evaluar el extracto crudo fue por motivo de estandarizar la técnica a una concentración conocida con significativa actividad por ambos métodos de difusión, pozo y disco. Igualmente, según los antecedentes la elección de una concentración a evaluar por disco y/o pozo ha sido arbitraria (5 mg/mL, 15 mg/mL, 157 ug/uL) ^(1, 4, 5). Solo un estudio realizó diluciones seriadas de fracciones del extracto en acetato de etilo empezando de una concentración de 100 mg/mL comparando difusión por pozos o discos; sin embargo el objetivo no fue hallar una concentración mínima inhibitoria (MIC), además según los resultados de inhibición no existió diferencia significativa entre las diluciones realizadas. ⁽⁵¹⁾ Para este estudio el tratamiento del disco fue realizado según la mayoría de artículos donde señalan como apropiado un diámetro de 6 mm y cargar el disco con un volumen concentrado de 25 uL. ^(12, 50, 51)

Existe evidencia limitada para la evaluación de extractos orgánicos usando la técnica de difusión en pozo. Esta técnica descrita por primera vez por Benett en 1996 ⁽⁵²⁾ y difundida en la región latinoamericana por Magaldi y cols en 1997 ⁽⁵³⁾ es descrita como un

procedimiento barato, rápido y de resultados comparables con aquellos obtenidos por difusión en disco. No obstante, no es libre de una falta de estandarización con respecto al diámetro y volumen de extracto principalmente. ^(7, 54) De acuerdo a la metodología empleada por este estudio, los pozos fueron perforados con un sacabocado de 6 mm de diámetro y 4 mm de profundidad donde cabe precisamente 25 uL. Esta técnica también fue empleada en la evaluación de extractos naturales como plantas ^(49, 51 53), microorganismos ^(14, 49, 50) y antibióticos. ^(52, 55) La fortaleza de este trabajo de investigación es haber considerado la equivalencia en el tratamiento de los pozos y discos; siendo ambos de igual diámetro, contener el mismo volumen de extracto y ser realizados por triplicado para hallar una media aritmética más significativa.

Los resultados de esta investigación no muestran que exista diferencia estadística entre la difusión en pozo contra la difusión en disco. Estos resultados contrastan con lo que halló Valgas y cols ⁽⁵¹⁾, quien con un $p < 0.05$, demuestra que la difusión en pozo es más sensible, o sea genera un mayor halo de inhibición que el disco. Estos datos deberán ser analizados con cautela porque si bien se utilizaron discos de igual diámetro (6 mm) estos fueron inoculados con distintos volúmenes de extracto (50 uL para pozo y 25 uL para disco). Y esto puede ser explicado debido a la mayor difusión del volumen de extracto por pozo la cual no se limita a la superficie del agar. Otra explicación tentativa trata sobre el comportamiento hidrofílico del disco, el cual permite una difusión más rápida e interrumpida de los compuestos apolares del extracto. ⁽⁵¹⁾

Por otro lado, del género *Streptococcus* se encontró limitada referencia bibliográfica. Por un lado en el estudio de Rojas (Colombia, 2005) evaluaron la actividad antimicrobiana de distintos extractos de plantas medicinales sobre diversos géneros bacterianos, entre ellos *Streptococcus* beta hemolítico cuyo halo de inhibición del extracto acetónico fue de 7 mm para difusión en pozo, y 16 mm por difusión en pozo. ⁽⁴⁹⁾

En nuestro país Guevara Duncan y cols (Lima, 2012) determinaron la efectividad de 10 plantas medicinales sobre *Streptococcus pneumoniae*. En su evaluación registraron que 2 plantas, almendro y *Bellaco caspi*, posee actividad antibiótica sobre el neumococo independiente de su perfil de susceptibilidad con antibióticos de uso clínico. ⁽⁶⁶⁾

En el presente estudio, se encontró que el extracto crudo de AF303 causa una significativa actividad de inhibición sobre ambos grupos de neumococo según su susceptibilidad. Se deberá tomar con precaución estos resultados ya que el neumococo es una bacteria muy

susceptible a factores externos como a la caracterizada labilidad en su conservación. Al utilizar para este estudio cepas clínicas conservadas por un período largo de tiempo se pueden ver alterada induciblemente la expresión de genes cromosómicos relacionados con la formación de la cápsula y/o pared celular de neumococo, resultando en una producción defectuosa de la diana de muchos compuestos conocidos con acción antibacteriana. Además, como recomendación de buenas prácticas de laboratorio en microbiología las guías internacionales para los ensayos del antibiograma se deben realizar el menor número de subcultivos a partir del aislamiento primario y no someter a la bacteria en su medio de conservación a procesos repetitivos de congelación-descongelación.

Para la metodología de extracción de metabolitos secundarios se planteó un protocolo donde se optimicen las similitudes y minimicen las diferencias entre experimentos previos. Como premisa general se acepta que el medio de fermentación se componga de una fuente abundante de carbohidratos, metales traza, agregados minerales y un pH promedio de 6. ^(1, 28, 58, 59) Diversos medios líquidos han sido preparados siguiendo estas recomendaciones: medio modificado de Jackson, medio de Vogel y agar Czapek. ^(1, 3) El común denominador de estos 3 medios es la presencia de sacarosa, metales traza como azufre y amonio, entre otros compuestos químicos que los caracterizan. El agar y caldo SPG es un medio innovador, reportado en las tesis de Hernández Guzmán y Hernández Torres ^(5, 8); el cual contiene sacarosa, sulfato de amonio y una fuente rica en almidón producto de la cocción de la papa. Debido a la facilidad y bajo costo en la preparación del medio, este fue usado para realizar los subcultivos, pre fermentación y fermentación del cultivo monospórico de AF. En relación a la temperatura óptima de incubación para la producción de metabolitos, no se optó por condiciones controladas de la temperatura ambiental como plantean otros autores ^(4, 50). Las características de incubación según Jacometti (2005) que logren incrementar la producción de metabolitos secundarios se resumen en: 30° C, un tiempo de incubación mayor a 144 horas a 120 revoluciones por minuto y un pH de 5.5.

La literatura existente en su mayoría ha evaluado los metabolitos secundarios extracelulares, es decir, aquello que son liberados al medio de cultivo desde el micelio o biomasa. En contraparte, otros investigadores han partido del tratamiento del micelio filtrado, medido y secado para la obtención de los metabolitos secundarios ^(4, 7, 12, 14) debido a particularidades como: viabilidad de las células, maceración sencilla y rápida, y

producción a mayor escala. ⁽¹²⁾ La interpretación al evaluar el efecto antibacteriano por ambos métodos nos permite comparar el comportamiento heterogéneo entre los metabolitos extraídos a partir del medio líquido de fermentación y el maceramiento del micelio. Por una parte, se demostró inexistente actividad de inhibición del micelio macerado en etanol sobre bacterias Gram positivas y levaduras ⁽⁴⁾; y por otro lado, se señala equivalente actividad biológica del micelio y el medio de cultivo de fermentación cuando ambos son evaluados. ⁽⁷⁾ También se ha reportado que solo los metabolitos intracelulares del micelio poseen efecto antimicrobiano, mas no lo tienen los metabolitos extracelulares. ⁽¹⁴⁾ Este estudio no trabajó con el micelio por razones del número de referencias cuales solo tratan con el medio líquido de fermentación, y por bioseguridad al minimizar el contacto con esporas altamente virulentas.

La etapa crítica en el procesamiento de la obtención del extracto crudo es la extracción líquido – líquido del medio de fermentación utilizando uno o más solventes de extracción. Existen estudios que comparan la efectividad de los solventes orgánicos según la polaridad (alta, mediana y baja) ^(3, 5, 12, 8), y es donde se concluye que los reactivos de baja a mediana polaridad como el acetato de etilo, cloroformo ⁽¹⁾, acetona ⁽⁷⁾, etc. poseen mejor efecto de transporte y extracción de metabolitos secundarios de alta polaridad, además de incrementar el rendimiento de la masa total del extracto crudo una vez evaporado el solvente de extracción. ⁽⁶⁰⁾ Igualmente para este estudio, debido a la mayor cantidad de datos previos para fines de comparación y la nula actividad antibacteriana intrínseca del acetato de etilo, este fue elegido como solvente de extracción para ser usado con el volumen filtrado (libre de conidias) del tiempo de fermentación del cultivo monospórico de AF. Para determinar el rendimiento de la obtención de la masa cruda se comparó la masa obtenida con el volumen de fermentación. Para el presente estudio se obtuvo una masa de 182 mg en 600 mL de caldo de cultivo. En comparación con otros estudios donde obtuvieron 15.7 mg en 500 mL ⁽⁵⁾, 600 mg en 2 L ⁽⁸⁾, y 8.3 g en 30 L ⁽⁷⁾; el rendimiento de mi estudio es más eficiente según la cepa, condiciones de fermentación y concentración del extracto.

La identificación cualitativa de los grupos funcionales que componen los metabolitos secundarios es el paso preliminar para caracterizar cualitativa y cuantitativamente los principios activos que posean actividad antimicrobiana sobre un determinado género. De AF ya se han aislado más de 226 metabolitos secundarios, con sus correspondientes actividad biológica y medicinal ⁽¹¹⁾, por lo que no sería productivo intentar encontrar un

nuevo compuesto orgánico con novedosa función. Como se acotó en el marco teórico de este estudio, la naturaleza de alcaloide abarca la mayor cantidad de metabolitos secundarios de AF; ya sean como compuestos nitrogenados heterocíclicos o anillos de diketopiperazines. Para fines prácticos, se buscó una metodología que evidencie macroscópicamente la presencia de alcaloides en el extracto orgánico, y esta sea evaluada mediante una escala semicuantitativa. Los reactivos de Mayer y Dragendorff son los más conocidos en farmacognosia al identificar alcaloides de manera no específica. ⁽⁶⁴⁾ Resultados similares han sido obtenidos en un extracto crudo de *Aspergillus flocculosus*, donde alcaloides, triterpenos pentacíclicos y esteroides insaturados fueron manifestados. ⁽³⁾ Cabe resaltar la importancia de instrumentación desde lo elemental como una cromatografía en capa fina ^(5, 7), a lo más sofisticado, como el HPLC ⁽⁴⁾ o la MS-GC ⁽¹⁾, que permita dilucidar precisamente la composición química de un extracto orgánico.

La principal limitación de este tipo de estudios es la falta de estandarización la cual es transversal en el procesamiento desde la extracción de metabolitos secundarios hasta la evaluación antimicrobiana. Existe un amplio rango de condiciones y técnicas que varían de autor en autor, como son: solvente de extracción, volumen del inóculo del extracto crudo, medio de cultivo de fermentación, condiciones de incubación, puntos de corte, etc. ⁽⁵⁴⁾ Las condiciones de fermentación, extracción y evaluación antimicrobiana ejecutadas en esta tesis fueron seleccionadas como consenso de las referencias bibliográficas y según la accesibilidad a instrumental y reactivos. El sesgo por la inexistencia de normalización del protocolo impedirá que mis resultados sean extrapolados para otras cepas clínicas, siempre y cuando no se reproduzcan las mismas condiciones experimentales.

Con respecto a la metodología de fermentación, se eligió 5 y 7 días para pre fermentación y fermentación respectivamente siguiendo el estudio de cinética de metabolismo de *Aspergillus sp* ^(5, 8). Alcanzados estos días de fermentación el hongo llega a la trofofase, fase meseta, donde es cuando se expresan los metabolitos secundarios ^(5, 29); y se fortaleció este concepto con la formación de biomasa en forma de *pellets* por germinación de las conidias presentes en el medio de fermentación y la transferencia de oxígeno. ⁽⁶³⁾ No obstante, es un sesgo haber determinado la particular cinética de crecimiento de una cepa clínica de AF que posee particularidades desde el aislamiento primario.

Un objetivo ulterior en este tipo de estudio de naturaleza preliminar será caracterizar la fracción de acetato de etilo donde por estudios de HPLC y MS-GC, con los cuales se

pueda aislar novedosos compuestos antimicrobianos que puedan servir de interés para la industria farmacéutica en la producción de principios activos sobre bacterias súper resistentes. Y es así como señalan diversos autores, que la metodología de este tipo de estudios abre nuevas perspectivas en investigación biomédica siendo la fuente de información para líneas secundarias sobre resistencia antimicrobiana en la era pos-antibiótica. ^(12, 22) Así mismo, estudios posteriores puedan reproducir la metodología sobre bacterias Gram negativas de importancia clínica en infecciones asociadas a la atención en salud o adquiridas en la comunidad.

Es importante tener en cuenta que estos resultados no podrán extrapolarse sobre el desempeño de susceptibilidad de otros antibióticos de uso empírico en la práctica clínica. Al no ser un procedimiento estandarizado, aún queda como sugerencia para estudios posteriores la determinación de la concentración mínima inhibitoria de una fracción purificada que posea acción sobre cocos Gram positivos; determinar qué punto de corte es sensible o resistente a estas bacterias, y comparar estas determinación con guías consenso internacionales como los manuales de desempeño en la evaluación antimicrobiana propuestos por consensos internacionales.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- El extracto crudo obtenido a partir de un aislamiento clínico de *Aspergillus fumigatus* posee actividad antimicrobiana sobre cepas clínicas sensibles y resistentes de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.
- En la caracterización química cualitativa para el extracto crudo de *A. fumigatus* se evidenció alta presencia de alcaloides, y mediana presencia de esteroides insaturados y triterpenos.
- La actividad antimicrobiana por disco difusión no es mayor sobre las cepas clínicas sensibles de *S. aureus* en comparación a las cepas resistentes.
- La metodología de difusión por pozo, en comparación a disco difusión, es estadísticamente mayor sobre todas las cepas clínicas con excepción de las cepas resistentes de *S. pneumoniae*.
- La actividad antimicrobiana por disco difusión del extracto orgánico de AF303 sobre cepas clínicas sensibles de *S. aureus* y neumococo no es significativamente mayor en comparación a la actividad sobre las cepas resistentes.

5.2. RECOMENDACIONES

- Para una mejor caracterización de la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus* se recomienda analizar el extracto orgánico mediante la técnica bioautografía (cromatografía en capa fina) y posteriormente obtener los perfiles de composición de los metabolitos de interés mediante MS-GC o HPLC.
- Si bien es cierto la difusión por pozo resultó produciendo mayores halos de inhibición, se recomienda seguir las evaluaciones por disco difusión ya que es una técnica menos laboriosa y esta estandarizada internacionalmente.
- Se recomienda analizar la curva de cinética de crecimiento (cuantificación de azúcares reductores y producción de biomasa en función del tiempo) de aislamientos clínicos de *Aspergillus fumigatus* según los días de fermentación en fase líquida con el fin de conocer en qué fase del crecimiento la expresión de metabolitos secundarios es mayor.
- Estandarizar la metodología de evaluación antibacteriana según el método de difusión en agar. Evaluar distintas concentraciones del extracto seco o liofilizado mediante fraccionamiento por cromatografía líquida al vacío (mg/mL) las cuales serían inoculadas en un disco estéril para las pruebas de susceptibilidad. Así mismo, estandarizar el volumen adecuado (uL) del extracto orgánico.
- Se recomienda analizar fracciones del extracto crudo extraídas con diversos solventes para identificar las sustancias con mayor actividad antimicrobiana. A partir de ello se purifica la fracción y finalmente será posible determinar una MIC por microdilución en caldo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Jacometti N., Vieira M., Kenupp J. The potential of an *Aspergillus fumigatus* strain to produce antimicrobial secondary metabolites. Brazilian Journal of Microbiology 2005; 36: 357-362.
- (2) Gutiérrez S. Los hongos como factorías celulares: biodiversidad de metabolitos secundarios. Rev Iberoam Micol 2000; 17: 54-60.
- (3) Acosta M., Guevara M., Crescente O. Actividad biológica de extractos en acetato de etilo de los hongos *Fusarium camptoceras* y *Aspergillus flocculosus*, aislados de ambientes marinos. Bol. Invest. Mar. Cost 2011; 40: 25-39.
- (4) Jacometti N., Said S., Yoko I., Kenupp J. The antimicrobial activity of *Aspergillus fumigatus* is enhanced by a pool of bacteria. Microbiol. Res. 2002; 157: 207–211.
- (5) Hernández A. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios detectados por fermentación en medio líquido de *Aspergillus sp* nativo del Páramo de Cruz Verde. [Tesis de grado]. Bogotá: Grupo de Investigación en Fitoquímica, Pontificia Universidad Javeriana; 2012.
- (6) Svahn S. Analysis of Secondary Metabolites from *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium nalgiovense*: Antimicrobial Compounds from Filamentous Fungi Isolated from Extreme Environments [PhD dissertation]. [Uppsala]; 2015.
- (7) Shaaban M., Nasr H., Hassan A., Asker M. Bioactive Secondary Metabolites From Endophytic *Aspergillus Fumigatus*: Structural Elucidation And Bioactivity Studies. Rev. Latinoamer. Quím. 2013; 41(1): 50–60.
- (8) Hernández Guzmán P. Evaluación de la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios detectados en la fermentación líquida de una cepa nativa de *Penicillium sp*. SPG 64 aislada del páramo de Guasca, Cundinamarca. [Tesis de grado]. Bogotá: Grupo de Investigación en Fitoquímica, Pontificia Universidad Javeriana; 2012.
- (9) Frisvad JC, Rank C, Nielsen KF, Larsen TO. Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. Med Mycol. 2009; 47(1): S53–71.
- (10) Kaul S, Gupta S, Ahmed M, Dhar MK. Endophytic fungi From medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. Phytochem Rev 2012; 11: 487-505.

- (11) Coleman J., Ghosh S., Okoli I., Mylonakis E. Antifungal Activity of Microbial Secondary Metabolites. PLoS ONE, 2011; 6(9): e25321.
- (12) Synytsya A., Monkai J., Bleha R., Macurkova A., Ruml T., Ahn J y Chukeatirote E. Antimicrobial activity of crude extracts prepared from fungal mycelia. Asian Pac J Trop Biomed 2017; 7(3): 257–261
- (13) Samson R, Hoekstra E, Van Oorschot C. Introduction To Food-Borne Fungi. . 2000.
- (14) Prabavathy D. y Valli Nachiyar C. Study on the antimicrobial activity of *Aspergillus* sp isolated from *Justicia adathoda*. Indian Journal of Science and Technology, 2012; 5 (9): 3317-3320
- (15) Cosgrove S.E., Sakoulas G., Perencevich E.N., Schwaber M.J., Karchmer A.W., Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. Clin Infect Dis. 2003; 36(1):53-9.
- (16) Ardura M.I. *Staphylococcus aureus*: old bug with new tricks. Rev Chil Infect. 2009; 26: 401-405.
- (17) Ochoa T.J. Resistance of *Streptococcus pneumoniae* to penicilin in nasopharyngeal children carriers, younger than two years old. Rev Med Hered. 1998, 9(2):56-62.
- (18) Luján D. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad: aspectos epidemiológicos y moleculares. An Fac med. 2013; 74(1):57-62.
- (19) Verón M., Ojeda M., Avino F., Spelzini A., Barboza A., Petrozzino Y. Incidencia y distribución estacional de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en pacientes adultos ambulatorios en una clínica de la provincia de Buenos Aires: período 2006 - 2011. Rev. Argent. Microbiol. 2012; 44(4): 306-311.
- (20) MINSA. Documento Técnico: Lineamientos para la Vigilancia, Prevención, y Control de las Infecciones Asociadas a la Atención de Salud; 2016.
- (21) Torres N. y colaboradores. Resistencia antibiótica de *Streptococcus pneumoniae* en portadores nasofaríngeos sanos de siete regiones del Perú. Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública 2013; 30(4): 575-582.
- (22) Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. P T 2015; 40: 277-83.
- (23) OMS. Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. 2016.

- (24) Paulussen C, Hallsworth J, Alvarez-Perez S, Nierman W, Hamill P, Blain D y cols. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microbial Biotechnology*, 2017; 10(2): 296–322.
- (25) Sanchez-Fernández, R. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2013; 16(2):132-146
- (26) Pontón J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología* 2008; 25 (1): 78-82p.
- (27) Romero S. Producción de Invertasa por *Aspergillus niger* en Fermentación Líquida y Fermentación Sólida. Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 2001.
- (28) Sanchez S y Demain AL. Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme Microb. Technol.*, 31, 895-906, 2002.
- (29) Demain, A. L. Regulation of secondary metabolism. In: *Biotechnology of Filamentous Fungi: technology and products* (Eds: Finkelstein, D. B., Ball, C.). ButterworthHeinemann. 1992: 89–112.
- (30) Montani M, Vaamonde G, Resnik SL, Buera P. Temperature influence on *Penicillium citrinum* Thom growth and citrinin accumulation kinetics. *ELSEVIER*. 2000; 7 (2): 15-122.
- (31) Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaaseen CH y cols. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Micology*. 2014; 48: 141-73.
- (32) Hope W, Kruhlak M, Lyman C, Petraitiene R, Petraistis V, Francesconi A y cols. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the Kinetics of Galactomannan in an In Vitro Model of Early Invasive Pulmonary Aspergillosis: Implications for Antifungal Therapy. *JID* 2007:195.
- (33) Cuervo-Maldonado S., Gómez-Rincón J., Rivas P., Guevara F. Actualización en Aspergilosis con énfasis en Aspergilosis invasora. *Infectio*. 2010; 14(S2): S131-S144.
- (34) Melloul E, Luiggi S, Anais L, Arne P, Costa JM, Fihman V y cols. Characteristics of *Aspergillus fumigatus* in Association with *Stenotrophomonas maltophilia* in an In Vitro Model of Mixed Biofilm. *PLoS ONE* 2016; 11(11).

- (35) Xavier M., Pasqualotto A., Uchoa M., Severo C., Peixoto J., Severo L. Invasive pulmonary aspergillosis due to a mixed infection caused by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus*. Revista Iberoamericana De Micología. 2008; 25(3):176-178.
- (36) Abad A., Fernandez-Molina J, Bikandi J, Ramirez A, Margareto J, Sendino J y cols. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. Revista Iberoamericana De Micología 2010; 27(4): 155-182.
- (37) Nierman , Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J y cols. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Nature. 2005; 438(26): 1151-56.
- (38) Muharni, Fitrya, Purwaningrum W, Yogi A. Secondary Metabolite From Endophytic Fungi *Aspergillus* Sp. The Leave Of Kunyit Putih (Curcuma Zedoaria (Berg) Roscoe). Molekul 2016; 11(1): 125 – 134.
- (39) Torrenegra RD, Baquero JE. Determinación de metabolitos secundarios a partir de una cepa nativa de *Penicillium spg* 28. aislada del Páramo de Guasca, departamento de Cundinamarca.
- (40) CLSI. Estándares del Desempeño para Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. 28va ed. CLSI suplemento M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- (41) Jiménez J, Ocampo AM, Vanegas JM, Rodriguez EA, Garces CG, Patiño LA y cols. Characterisation of virulence genes in methicillin susceptible and resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a paediatric population in a university hospital of Medellín, Colombia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2011; 106(8): 980-985.
- (42) Mizobuchi S., Minami J., Jin F., Matsushita O., Okabe A. Comparison of the Virulence of Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Immunol. 1994; 38(8): 599-605.
- (43) Amauri A, Vidal L, Vidal J, Hernandez L. *Streptococcus pneumoniae*, mecanismos de resistencia antimicrobiana. Revista Cubana de Pediatría. 2011; 83(3): 288-295.
- (44) Castellano M., Perozo-Mena A. Mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos en *Staphylococcus aureus*. Kasmera 2010; 38(1): 18 - 35.
- (45) Aziz J., Mazyar Z., Marzieh J., Shohreh F., Abdolvahab A., Noraladdin R. Antibacterial susceptibility patterns and cross-resistance of methicillin resistant and

- sensitive *Staphylococcus aureus* isolated from the hospitalized patients in Shiraz, Iran. Braz. J. Microbiol. 2010; 41(3): 567-573.
- (46) Sanchez M, Hernandez O, Velasquez L, Rivas D, Marin A, Gonzales L y col. Caracterización del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados de tres grupos poblacionales de la ciudad de Medellín. Infectio. 2013; 17(2):66–72.
- (47) Medeiros M. y cols. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients in the northeastern macroregion of São Paulo state, Brazil, 1998-2013. J Bras Patol Med Lab, 2017; 53(3): 177-182.
- (48) Cueto G., Pérez M. *Streptococcus pneumoniae* aislados de infecciones invasivas: serotipos y resistencia antimicrobiana. Rev Cubana Med Gen Integr 2007; 23(1).
- (49) Rojas J., García A. y López A. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. BLACPMA, 2005; 4(2): 28-32
- (50) Kalyani P. y Hemalatha K. In Vitro Antimicrobial Potential of *Aspergillus niger* (MTCC-961). International Journal of ChemTech Research, 2017; 10(4): 430-435
- (51) Valgas C., Machado de Souza M., Smânia E. y Smânia A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. Braz. J. Microbiol. vol.38 no.2 São Paulo Apr./June 2007
- (52) Bennett J., Brodie J., Benner E. y Kirby W. Simplified, Accurate Method for Antibiotic Assay of Clinical Specimens. APPUED MICROBIOLOGY, 1996; 14 (2).
- (53) Magaldi S., Mata-Essayag S., Hartung de Capriles C., Perez C., Colella M., Olaizola C. y Ontiveros Y. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. International Journal of Infectious Diseases, 2004; (8): 39-45
- (54) Balouiri M., Sadiki M. y Koraichi Ibnsouda S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis 6 (2016) 71–79
- (55) Holder I. y Boyce S. Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture. Bums, 1994; 20 (5): 426-429
- (56) Espinoza A., Guzmán S., Ruiz B. y Sánchez S. Búsqueda de hongos productores de metabolitos con actividad antimicrobiana asociados a *Magnolia dealbata* Zucc. BioTecnología 2014; 18 (2): 12-26.
- (57) Tan RX & Zou WX (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. Nat. Prod. Rep. 18: 448-459.

- (58) Pfefferle, C.; Theobald, U.; Gürtler, H.; Fiedler, H.P. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J. Biotechnol.*, 80, 135-142, 2000.
- (59) Frisvad J, Andersen B, Thrane U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological research*. 2008; 2, 231–240.
- (60) Elias B., Said S., de Albuquerque S. y Pupo M. The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierck. *Microbiological Research* 2006; 161: 273—280
- (61) Kupfahl C, Michalka A, Lass-Floerl C, Fischer G, Haase G y cols. *Glutathione production by clinical and environmental Aspergillus fumigatus strains. Int J Med Microbiol*; 2008, 298: 319–327.
- (62) Segura L.M. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios obtenidos por fermentación en medio sólido de *Penicillium Roseopurpureum* Nativo del Páramo de Guasca, Cundinamarca. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2006, 43p.
- (63) Kim YM. Y Song HG. Effect of fungal pellet morphology on enzyme activities involved in phtalatedegradation. *Journal of Microbiolgy*. 2009; 47(4):420-424
- (64) Torres J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de Luma chequen (molina) a. gray “arrayán” frente a patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Lima - Perú. (Tesis pregrado). UNMSM, 2014
- (65) Sanchez J. y Wang C. The chemical identification and analysis of *Aspergillus nidulans* secondary metabolites. *Methods Mol Biol*. 2012; 944: 97–109.
- (66) Guevara Duncan JM, Fuertes Ruitón C, Valencia Bazalar E, Guevara Granados JMM, Zerpa Larrauri R, Bejar Castillo y cols. Acción in vitro de diez plantas medicinales sobre diez cepas diferentes de *Streptococcus pneumoniae*. *An Fac med*. 2012;73(4):281-3

ANEXOS

ANEXO 1

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS

I. Evaluación de cepa ATCC de *Aspergillus fumigatus*

1. La cepa referencial de *Aspergillus fumigatus* será sometida a las mismas condiciones de identificación, aislamiento, fermentación y extracción de metabolitos secundarios tal cual el protocolo será aplicado con las cepas clínicas.
2. El extracto crudo será liofilizado para su posterior concentración a 100 mg/mL en DMSO al 5% la cual nos permita determinar la actividad antimicrobiana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
3. Se evaluará la actividad antimicrobiana del extracto mediante difusión en agar, por disco y pozo, sobre las cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.

II. Extracción de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus*

1. Reactivación de la cepa *Aspergillus fumigatus*

Para la reactivación de la cepa clínica tipificada de *Aspergillus fumigatus* se repicará en Agar Papa Dextrosa (APD) y en medio CYA para su respectiva purificación e identificación macroscópica y microscópica respectivamente según Samson 2014; Klich y Pitt 1988.

- Para determinar el control de esterilidad se incubarán los medios APD y CYA por 7 días a 25°C.
- Los medios APD y CYA sembrados serán llevados a incubación durante 7 días a 25°C.
- Al obtener el crecimiento del micelio se evaluará la pureza de la cepa por medio de tinción con azul de lactofenol para la identificación microscópica del hongo *Aspergillus fumigatus*.
- Se realizarán subcultivos de las cepas reactivadas en medio SPG (sulfato de amonio, papa, dextrosa) para la obtención del cultivo monospórico.

2. Obtención de cultivo monospórico

- Del cultivo de *Aspergillus fumigatus* se utilizará una concentración de $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ conidios/ml según Hernández 2012.
- Preparar una solución Tween 80 al 1% (v/v)
- Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos.
- Se añadirá 10 mL de una solución estéril de Tween 80 al 1% (v/v) a tubos inclinados con medio de cultivo SPG, sembrados con la cepa de *Aspergillus fumigatus* para el posterior desprendimiento de conidios.
- Realizar diluciones seriadas transfiriendo 0.5 mL a 4.5 mL de agua peptonada estéril al 0.1% (v/v) para obtener una dilución de 10^{-1} .
- Mediante la técnica de recuento en Cámara de Neubauer se escogerá la dilución respectiva a una concentración de 1×10^6 conidios/mililitro.

3. Fermentación

- *Pre-inóculo*

En un matraz de Erlenmeyer (250 mL) se verterá 45 mL de caldo SPG se inoculará 5 mL de inóculo con una concentración de 10^6 conidios/mL conservando la proporción 1/5, dejándose en agitación constante a 120 rpm durante 5 días, esperando que el hongo alcance su fase exponencial.

- Se prepararán en un Erlenmeyer (1000 mL) 250 mL de caldo SPG y se le adicionará 50 mL del pre-inóculo preparado anteriormente. Se dejará en agitación continua a 120 rpm a temperatura ambiente durante 7 días conservando la proporción 1/5 siguiendo la técnica de fermentación de Damian 1996, Daza 2001.

4. Extracción de metabolitos secundarios

- El caldo de fermentación será filtrado mediante sistema al vacío usando un filtro con poros de 0.22 μ m a fin de eliminar restos del micelio, conservando el caldo en un frasco estéril.
- Para la obtención del extracto crudo se utilizara una pera de decantación donde se mezclara el caldo de fermentación con el solvente de extracción, acetato de etilo, realizando 3 particiones o lavados en proporciones v/v.
- La fase acuosa y la fase orgánica serán conservadas en frascos color ámbar para la posterior liofilización y concentración.

IV. Prueba de actividad antibacteriana

- Según el control de calidad interno recomendado por CLSI, las características del medio Mueller – Hinton cumplirán las siguientes características:
 - pH del medio: 7,2 – 7,4
 - Profundidad del agar: 4 mm
 - Esterilidad: incubar el 5% de las placas a 35° por 24 horas.
- Se utilizará el medio estandarizado de Mueller – Hinton para el cultivo de cepas sensible y resistente de *Staphylococcus aureus*.
- Se utilizará el medio modificado Mueller – Hinton con sangre de carnero al 5% para el cultivo de cepas sensible y resistente de *Streptococcus pneumoniae*.
- Se verterá 25-30 mL de agar Müller – Hinton en placas Petri de 100 mm de diámetro.
- Se preparará una suspensión bacteriana de cada una de las cepas en evaluación: *S. aureus* meticilino sensible y resistente, y *S. pneumoniae* penicilino sensible resistente) equivalente a 0.5 McFarland el cual es equivalente aproximadamente a 1.5×10^8 UFC/mL según CLSI 2018.
- Seguidamente se elaboraran pozos de 6 mm de diámetro con 4 mm de profundidad y colocarán discos de papel Whatman N° 3 de 6 mm de diámetro para la inoculación de los extractos de evaluación y controles.
- Los pozos y discos serán inoculados con 25 uL del extracto a evaluar (control extracto) y 25 uL del solvente de extracción como control negativo.
- Finalmente las placas con la siembra de *S. aureus* se incubarán a 35 +/- 2 °C por 16-18 horas, y las placas con siembra de *S. pneumoniae* serán incubadas a 35 +/- 2 °C con 5% de CO₂ por 20-24 horas siguiendo las indicaciones de la guía M-100 CLSI 2018.
- Culminado el tiempo de incubación se evidenciará la presencia o no de halos de inhibición de crecimiento alrededor de los pozos y discos con el extracto a evaluar y los controles negativos.
- La presencia de halos de inhibición alrededor de los controles negativos invalidará la lectura de la placa.
- Si se evidencia presencia de halos de inhibición se procederá a medirlos con un vernier y anotar los resultados en el formato de recolección de datos.

ANEXO 2

Instrumento de Recolección de Datos

<u>Medición de halos de inhibición de crecimiento bacteriano</u>			
Responsable		Instrumento	VERNIER
Fecha		Incertidumbre	+/- 0.01 mm

Extracto crudo de <i>Aspergillus fumigatus</i>								
Número de cepa:								
Condiciones de fermentación:								
Concentración:								
CEPAS CLÍNICAS BACTERIANAS			HALO DE INHIBICIÓN EN POZO		HALO DE INHIBICIÓN EN DISCO		HALO DE INHIBICION EN CONTROL NEGATIVO	
			SÍ	NO	SÍ	NO	SÍ	NO
<i>Staphylococcus aureus</i>	MSSA	CEPA 1						
		CEPA 15						
	MRSA	CEPA 1						
		CEPA 15						
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PSSP	CEPA 1						
		CEPA 15						
	PRSP	CEPA 1						
		CEPA 15						

ANEXO 3

Resolución rectoral 4274-R-17

Fecha: 02/06/2017
Hora: 11:49:40



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Vicerrectorado de Investigación y Posgrado



© RAIS
Usuario: RORTEGA




Proyectos de Investigación con Financiamiento para Grupos de Investigación Año - 2017

Área: A Ciencias de la Salud

Facultad: Medicina

27 A17011751	CARACTERIZACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE ASPERGILLUS FUMIGATUS, AISLADOS DE INFECCIONES PULMONARES Y SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA SOBRE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS MULTI-DRUGO-RESISTENTES (MDR)				30,000.00
Condición en proyecto	Apellidos y nombres	Tipo	Facultad	Condición en GI	
Responsable					
001604	REJAR CASTILLO VILVA RUTH	Docente Permanente	Medicina	Coordinador	
Co-Responsable					
004447	GUEVARA GRANADOS JOSE MARIA MIGUEL	Docente Permanente	Medicina	Adjunto	
Integrante Docente					
005302	CABEZAS SANCHEZ CESAR AUGUSTO	Docente Permanente	Medicina	Adjunto	
011489	TICOMA CHAVEZ EDUARDO ROMULO	Docente Permanente	Medicina	Adjunto	
Tejista					
10010379	GAVIOLA MIRANDA EDSON ALFREDO	Estudiante Pre Grado	Medicina	Adherente	
	SALAZAR PISCOYA FREDDY OMAR	Estudiante Post Grado	Medicina	Adherente	
	SANCHEZ PEREZ JORGE ANDRES	Estudiante Pre Grado	Medicina	Adherente	
Integrante Externo					
	VILLANUEVA COTRINA FREDDY	Externo		Adjunto Externo	
	ZAVALETA ZAVALETA NILAGROS	Externo		Adjunto Externo	

Nombre del Grupo: UNIDAD DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL SERVICIO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TROPICALES DEL HOSPITAL NACIONAL DOS DE MAYO (TROPIMAYO)

Nro	Código	Título del proyecto		Presupuesto:		
28	A17010791	EVALUACIÓN DE NUTRICIÓN ENTERAL POR GASTROSTOMÍA EN PACIENTES CON DESNUTRICIÓN SEVERA E INFECCIÓN POR VIH O TUBERCULOSIS		30,000.00		
		Condición en proyecto	Apellidos y nombres	Tipo	Facultad	Condición en GI
						
		Responsable				
		011489	TICOMA CHAVEZ EDUARDO ROMULO	Docente Permanente	Medicina	Adjunto
		Co-Responsable				
		000776	RAMIRO FLORES RAMIRO ANGEL	Docente Permanente	Medicina	Adjunto
		Integrante Docente				
		000405	CHAVEZ PEREZ VICTOR MANUEL	Docente Permanente	Medicina	Adjunto
		000391	HUARDO VALDIVIA LUZ MARIA	Docente Permanente	Medicina	Adjunto
		001012	PAJUELO RAMIREZ JAMES RENZO	Docente Permanente	Medicina	Adjunto
		Tejista				
		12010245	QUIBPE PAUCAR LAURA BEATRIZ	Estudiante Pre Grado	Medicina	Adherente
		Estudiante				
		15017403	CONTRERAS MARTINEZ CARMEN CECILIA	Estudiante Post Grado	Medicina	Adherente
		000362	VALENCIA VASQUEZ PEDRO GUSTAVO	Estudiante Post Grado	Medicina	Adherente
		12010432	VELÁSQUEZ RIVACHI VICTOR ANDRÉS	Estudiante Pre Grado	Medicina	Adherente
		12010420	VILLAFUERTE MELIA KAROLINA BETTY	Estudiante Pre Grado	Medicina	Adherente
		Integrante Externo				
			MUÑOZA PINEDA RAQUEL ISABEL	Externo		Adjunto Externo
			RODRIGUEZ GUERRERO PAOLA IBETT	Externo		Adjunto Externo
			SORIA MEDINA JAMES ISMAEL	Externo		Adjunto Externo
						
						

29 A17011871	MICROALBUMINURIA EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH EN TERAPIA ANTIRETROVIRAL EN EL HOSPITAL NACIONAL DOS DE MAYO			25,440.00
Condición en proyecto	Apellidos y nombres	Tipo	Facultad	Condición en GI
Responsable				
000405	CHAVEZ PEREZ VICTOR MANUEL	Docente Permanente	Medicina	Adjunto

ANEXO 4

Fichas Internacionales de Seguridad Química

ACETATO DE ETILO

ICSC: 0367







**MINISTERIO
DE TRABAJO
Y ASUNTOS SOCIALES
ESPAÑA**





**INSTITUTO NACIONAL
DE SEGURIDAD E HIGIENE
EN EL TRABAJO**

ACETATO DE ETILO
 Acido acético, éster etílico
 $C_4H_8O_2/CH_3COOC_2H_5$
 Masa molecular: 88.1









Nº CAS 141-78-6
 Nº RTECS AH5425000
 Nº ICSC 0367
 Nº NU 1173
 Nº CE 607-022-00-5



TIPOS DE PELIGRO/ EXPOSICION	PELIGROS/ SINTOMAS AGUDOS	PREVENCION	PRIMEROS AUXILIOS/ LUCHA CONTRA INCENDIOS
INCENDIO	Altamente inflamable.	Evitar llama abierta, NO producir chispas y NO fumar.	AFFF, espuma resistente al alcohol, polvos, dióxido de carbono.
EXPLOSION	Las mezclas vapor/aire son explosivas.	Sistema cerrado, ventilación, equipo eléctrico y de alumbrado a prueba de explosiones Evitar la generación de cargas electrostáticas (por ejemplo, mediante conexión a tierra). Utilícense herramientas manuales no generadoras de chispas.	En caso de incendio: mantener fríos los bidones y demás instalaciones por pulverización con agua. Los bomberos deberían emplear indumentaria de protección completa, incluyendo equipo autónomo de respiración.
EXPOSICION			
• INHALACION	Tos, vértigo, somnolencia, dolor de cabeza, náusea, jadeo, dolor de garganta, pérdida de conocimiento, debilidad.	Ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo, posición de semiincorporado y someter a atención médica. Respiración artificial si estuviera indicado.
• PIEL	Enrojecimiento, dolor.	Guantes protectores, traje de protección.	Quitar las ropas contaminadas, aclarar la piel con agua abundante o ducharse y solicitar atención médica.
• OJOS	Enrojecimiento, dolor.	Gafas ajustadas de seguridad.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después consultar a un médico.
• INGESTION	Dolor abdominal, vértigo, náusea, dolor de garganta, debilidad.		Enjuagar la boca, dar a beber abundante agua y someter a atención médica.

DERRAMAS Y FUGAS	ALMACENAMIENTO	ENVASADO Y ETIQUETADO
Evacuar la zona de peligro. Recoger en la medida de lo posible el líquido que se derrama y el ya derramado en recipientes herméticos. Absorber el líquido residual en arena o absorbente inerte y trasladarlo a lugar seguro. (Protección personal adicional: traje de protección completa incluyendo equipo autónomo de respiración).	A prueba de incendio. Separado de oxidantes fuertes, ácidos y bases. Mantener en lugar frío, seco. Almacenar herméticamente cerrado.	símbolo F símbolo Xi R: 11-36-66-67 S: (2)-16-26-33 Clasificación de Peligros NU: 3 Grupo de Envasado NU: II CE: <div style="display: flex; justify-content: center; gap: 10px;">   </div>

DICLORURO DE MERCURIO			ICSC: 0979	
			Noviembre 2003	
Cloruro de mercurio			Cloruro de mercurio (II)	
CAS:	7487-94-7	HgCl ₂	 	
RTECS:	OV9100000	Masa molecular: 271.5		
NU:	1624			
CE Índice Anexo I:	080-010-00-X			
CE / EINECS:	231-299-8			
TIPO DE PELIGRO / EXPOSICIÓN	PELIGROS AGUDOS / SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS / LUCHA CONTRA INCENDIOS	
INCENDIO	No combustible. En caso de incendio se desprenden humos (o gases) tóxicos e irritantes.		En caso de incendio en el entorno: usar un medio de extinción adecuado.	
EXPLOSIÓN				
EXPOSICIÓN		¡EVITAR TODO CONTACTO!	¡CONSULTAR AL MÉDICO EN TODOS LOS CASOS!	
Inhalación	Tos. Dolor de garganta. Sensación de quemazón. Jadeo.	Extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Posición de semiincorporado. Proporcionar asistencia médica.	
Piel	¡PUEDE ABSORBERSE! Enrojecimiento. Dolor. Ampollas. Quemaduras cutáneas.	Guantes de protección. Traje de protección.	Quitar las ropas contaminadas. Aclarar con agua abundante o ducharse. Proporcionar asistencia médica.	
Ojos	Dolor. Enrojecimiento. Visión borrosa. Quemaduras profundas graves.	Pantalla facial o protección ocular combinada con protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después proporcionar asistencia médica.	
Ingestión	Calambres abdominales. Dolor abdominal. Sensación de quemazón. Gusto metálico. Diarrea. Náuseas. Dolor de garganta. Vómitos. Shock o colapso.	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo. Lavarse las manos antes de comer.	Enjuagar la boca. Dar a beber una papilla de carbón activado en agua. Proporcionar asistencia médica.	
DERRAMES Y FUGAS		ENVASADO Y ETIQUETADO		
Protección personal: traje de protección química, incluyendo equipo autónomo de respiración. NO verterlo en el alcantarillado. Barrer la sustancia derramada e introducirla en un recipiente; si fuera necesario, humedecer el polvo para evitar su dispersión. Recoger cuidadosamente el residuo, trasladarlo a continuación a un lugar seguro. NO permitir que este producto químico se incorpore al ambiente.		No transportar con alimentos y piensos. Contaminante marino grave. Clasificación UE Símbolo: T+, N R: 28-34-48/24/25-50/53 S: (1/2-)36/37/39-45-60-61 Clasificación NU Clasificación de Peligros NU: 6.1 Grupo de Envasado NU: II		
RESPUESTA DE EMERGENCIA		ALMACENAMIENTO		
Ficha de Emergencia de Transporte (Transport Emergency Card): TEC (R)-61GT5-II		Separado de alimentos y piensos, metales ligeros. Almacenar en un área sin acceso a desagües o alcantarillas. Medidas para contener el efluente de extinción de incendios.		
<div><div><div>IPCS International Programme on Chemical Safety</div><div></div><div></div></div><div>Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión Europea © IPCS, CE 2005</div></div>				

ÁCIDO SULFÚRICO			ICSC: 0362 Febrero 2000
CAS: RTECS: NU: CE Índice Anexo I: CE / EINECS:	7664-93-9 WS5600000 1830 016-020-00-8 231-639-5	Ácido sulfúrico 100% Aceite de vitriolo H ₂ SO ₄ Masa molecular: 98.1	
TIPO DE PELIGRO / EXPOSICIÓN	PELIGROS AGUDOS / SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS / LUCHA CONTRA INCENDIOS
INCENDIO	No combustible. Muchas reacciones pueden producir incendio o explosión. En caso de incendio se desprenden humos (o gases) tóxicos e irritantes.	NO poner en contacto con sustancias inflamables. NO poner en contacto con combustibles.	NO utilizar agua. En caso de incendio en el entorno: polvo, espuma, dióxido de carbono.
EXPLOSIÓN	Riesgo de incendio y explosión en contacto con bases, sustancias combustibles, oxidantes, agentes reductores o agua.		En caso de incendio: mantener fríos los bidones y demás instalaciones rociando con agua pero NO en contacto directo con agua.
EXPOSICIÓN		¡EVITAR LA FORMACIÓN DE NIEBLAS DEL PRODUCTO! ¡EVITAR TODO CONTACTO!	¡CONSULTAR AL MÉDICO EN TODOS LOS CASOS!
Inhalación	Corrosivo. Sensación de quemazón. Dolor de garganta. Tos. Dificultad respiratoria. Jadeo. Síntomas no inmediatos (ver Notas).	Ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio, reposo. Posición de semincorporado. Respiración artificial si estuviera indicada. Proporcionar asistencia médica.
Piel	Corrosivo. Enrojecimiento. Dolor. Ampollas. Quemaduras cutáneas graves.	Guantes de protección. Traje de protección.	Quitar las ropas contaminadas. Aclarar la piel con agua abundante o ducharse. Proporcionar asistencia médica.
Ojos	Corrosivo. Enrojecimiento. Dolor. Quemaduras profundas graves.	Pantalla facial o protección ocular combinada con protección respiratoria.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad), después proporcionar asistencia médica.
Ingestión	Corrosivo. Dolor abdominal. Sensación de quemazón. Shock o colapso.	No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo.	Enjuagar la boca. NO provocar el vómito. Proporcionar asistencia médica.
DERRAMES Y FUGAS		ENVASADO Y ETIQUETADO	
Consultar a un experto. ¡Evacuar la zona de peligro! NO absorber en serrín u otros absorbentes combustibles. Protección personal adicional: traje de protección completo incluyendo equipo autónomo de respiración. NO permitir que este producto químico se incorpore al ambiente.		Envase irrompible; colocar el envase frágil dentro de un recipiente irrompible cerrado. No transportar con alimentos y piensos. Clasificación UE Símbolo: C R: 35 S: (1/2-)26-30-45 Nota: B Clasificación NU Clasificación de Peligros NU: 8 Grupo de Envasado NU: II	
RESPUESTA DE EMERGENCIA		ALMACENAMIENTO	
Ficha de Emergencia de Transporte (Transport Emergency Card): TEC (R)-80S1830 o 80GC1-II+III Código NFPA: H3; F0; R2; W		Separado de sustancias combustibles y reductoras, oxidantes fuertes, bases fuertes, alimentos y piensos, materiales incompatibles. Ver Peligros Químicos. Puede ser almacenado en contenedores de acero inoxidable. Almacenar en un área con suelo de hormigón resistente a la corrosión.	
Preparada en el Contexto de Cooperación entre el IPCS y la Comisión Europea © CE, IPCS, 2005			
<div><div><div>IPCS International Programme on Chemical Safety</div><div></div></div></div>			

ANEXO 5

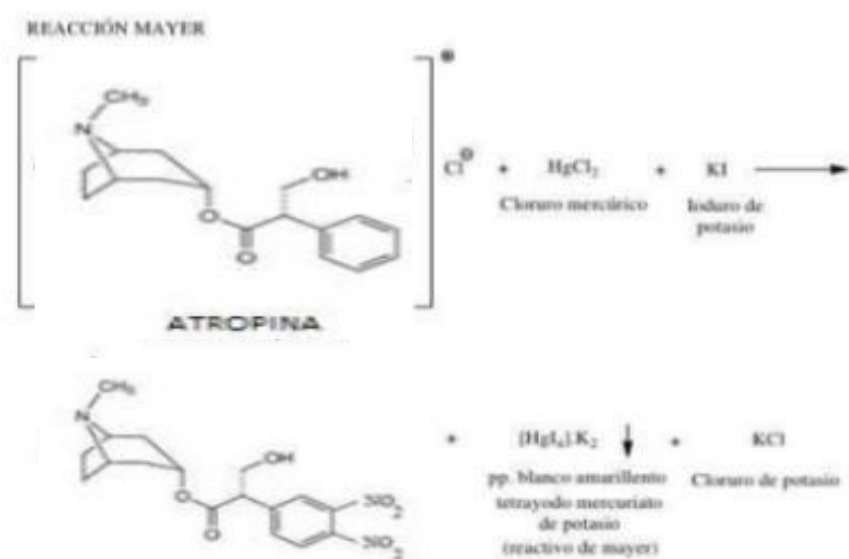
ECUACIONES QUÍMICAS DE LAS REACCIONES PARA LA DETECCIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Aspergillus fumigatus*

- Ecuación química para la detección de alcaloides según el reactivo de Mayer.

El reactivo de Mayer se prepara disolviendo 1.3 g de dicloruro de mercurio en 60 mL de agua y 5 g de yoduro de potasio y se afora a 100 mL. Los alcaloides se detectan como un precipitado blanco o de color crema soluble en ácido acético y etanol.

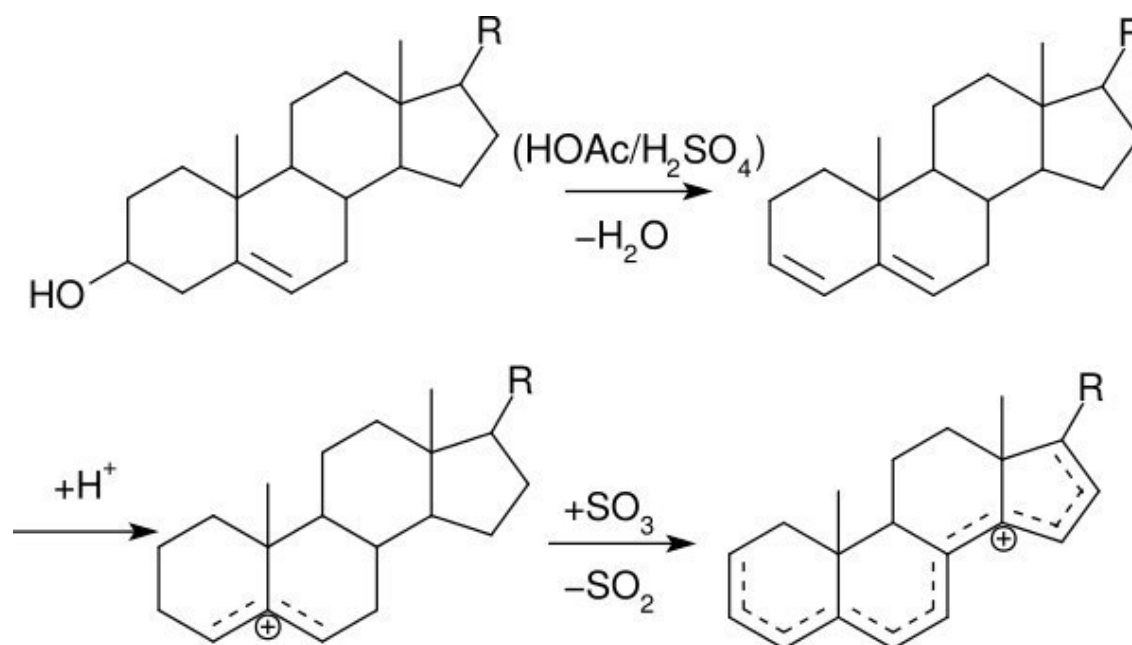
Al ser un extracto crudo, sin generar fraccionar acorde al Rf de los alcaloides, no es posible detallar la ecuación para un determinado alcaloide. Sin embargo el esquema es genérico según la reacción con el dicloruro de mercurio y yoduro de potasio.

Se utiliza atropina como control positivo de alcaloides extraídos de plantas acuerdo a la farmacognosia.



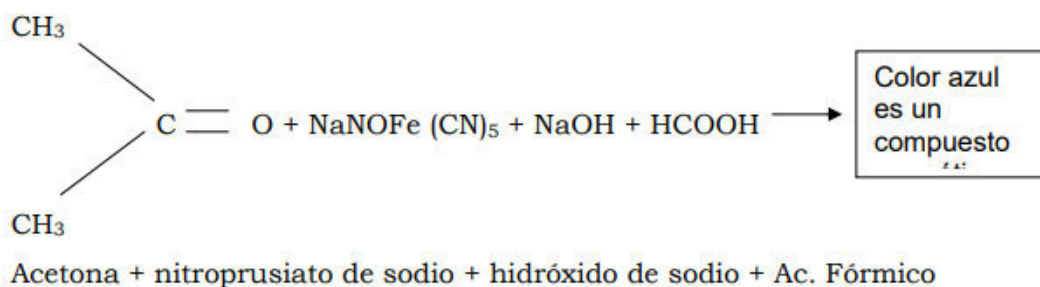
- Ecuación química para la detección de terpenos y esteroides según la reacción de Libermann – Burchard

La reacción se realiza en un medio ácido fuerte formado por: ácido sulfúrico, ácido acético y anhídrido acético. El control positivo, colesterol, sufre una oxidación gradual formándose por etapas una molécula de colestapolieneo con un doble enlace adicional con respecto al compuesto del cual deriva. La primera etapa consiste en la protonación del grupo OH del colesterol, con la pérdida de agua obteniéndose el ion carbonio 3,5 – colestadieno que constituye el primer paso de la reacción de color. (Clavo Valdivieso L y Ramirez Vega S. Composición química de órganos de cobayo de altura. 2002)



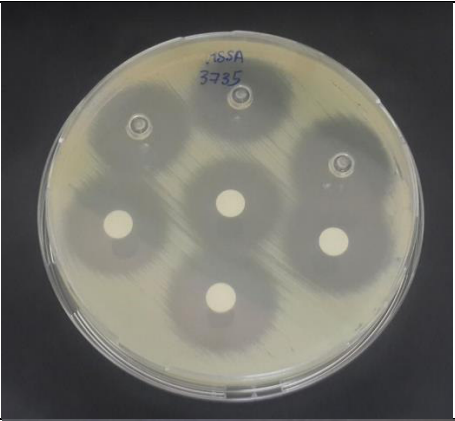

- Ecuación química para la detección de sesquiterpenlactonas según la reacción de Legal

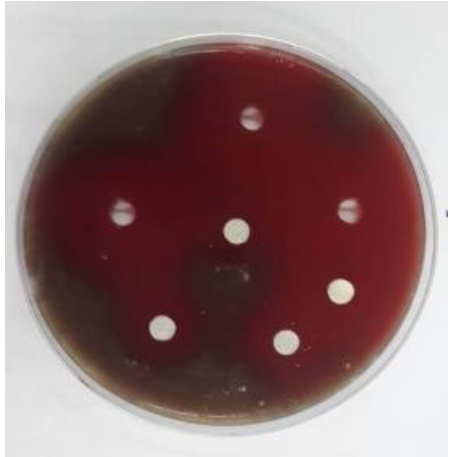
En un tubo de ensayo se agrega 0.5 ml de la muestra del problema, se usa acetona como control positivo. Se añade nitroprusiato de sodio $\text{Na}_2\text{NOFe}(\text{CN})_5$ (0.3 ml). El medio base fue hidróxido de sodio (0.3 ml.) hasta alcanzar la alcalinidad y agitar; se obtiene coloración rojiza. Se puede añadir 3 o 4 gotas de ácido fórmico y dejar en reposo; puede variar a azul si es aromático o violeta se el compuesto es alifático.



ANEXO 6

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE AF303 SOBRE CEPAS CLÍNICAS SENSIBLES Y RESISTENTES DE *Staphylococcus aureus* Y *Streptococcus pneumoniae*.

Cepa clínica	Código	Actividad antimicrobiana de AF303 por disco		Figuras	
		Disco	Pozo		
<i>Staphylococcus aureus</i> metecilino sensible	3735	24.7 mm	23.7 mm		
<i>Staphylococcus aureus</i> metecilino resistente	3741	21 mm	23 mm		

<i>Streptococcus pneumoniae</i> penicilino sensible	8C	22 mm	26.3 mm	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> penicilino resistente	1B	25 mm	24.7 mm	